JUSTUS LIEBIG'S
ANNALEN
DER
CHEMIE.

HERAUSGEGEBEN
VON

O. WALLACH, C. GRAEBE, TH. ZINCKE,
R. WILLSTÄTTER UND W. WISLICENUS.

BAND 425.

LEIPZIG.
C. F. WINTER'SCHE VERLAGSHANDLUNG
1921.

Digitized by Google

Chemistry Lib.

Digitized by Google

Inhaltsanzeige des 425. Bandes.

Erstes und zweites Heft.

Seite

Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.

Willstätter, Richard, und Fritz Racke, Zur Kenntnis des Invertins 1

Mitteilung aus dem Chemischen Institut der Universität Freiburg.

Gattermann, Ludwig†, und Hans Rolfes, Über Azide, Anthranile und Azoderivate des Anthrachinons . . . 135

Aus den Chemischen Instituten der Universitäten Straßburg und Münster.

Über freie Ammoniumradikale.

I. Weitz, Ernst, Adolf Roth† und Annemarie Nelken, Das Benzoylpyridinium 161

Aus dem Chemischen Institut der Universität Münster.

II. Weitz, Ernst, und Annemarie Nelken (mitbearbeitet von R. Ludwig), Das Benzylpyridinium . 187

Mitteilung aus dem Chemischen Universitätslaboratorium zu Freiburg i. B.

Fromm, Emil, und Richard Klein, Über Olibanole . 208

Drittes Heft.

Seite

Mitteilungen aus dem Chemischen Institut der Universität Marburg.

I. v. Auwers, K., und K. Ziegler, Über Kohlenwasserstoffe der Semibenzolgruppe 217

II. v. Auwers, K., und K. Ziegler, Über Carbonsäuren der Semibenzolgruppe 280

III. v. Auwers, K., und K. Ziegler, Über Chlor- und Bromderivate alkylierter Cyclohexadienone 295

Mitteilung aus dem Chemischen Institut der Universität Münster i. W.

Ott, Erwin, und Kurt Zimmermann, Über natürliche und künstliche Pfefferstoffe und die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Pfeffergeschmack . . . 314

K. Fleischer, Berichtigung 338

Digitized by Google

JUSTUS LIEBIG'S
ANNALEN DER CHEMIE.

425. Band.

Zur Kenntnis des Invertins;

von *Richard Willstätter* und *Fritz Racke.*

[Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München.]

(Eingelaufen am 15. Oktober 1920.)

Inhalts-Übersicht.

Seite

A. Über die Lösung des Invertins aus der Hefe 2
I. Probleme bei der Darstellung von Invertinlösungen 2
II. Bestimmung von Invertin in den Auszügen . . . 6
III. Bestimmung des Invertins in der Hefe 9
IV. Kritik der Methoden zur Isolierung aus der Hefe . 16
1. Das Wesen des Lösungsvorganges 16
2. Verhalten lebender Hefe gegen Wasser 19
3. Invertinlösung aus kurz zerriebener Hefe . . . 20
4. Invertinlösung aus Hefepreßsaft 21
5. Invertinlösung aus Trockenhefe 21
6. Invertinlösung durch langsame Autolyse 25
7. Invertinlösung durch beschleunigte Autolyse . . 27
V. Rasche Autolyse unter verschiedenen Bedingungen . 30
VI. Invertinbildung in abgetöteter Hefe 35
VII. Über die Freilegung des Invertins 37
a) Löslichkeit des Invertins der zerriebenen Hefe . 38
b) Löslichkeit des Invertins nach Hefeverflüssigung durch verschiedene Zellgifte 40
VIII. Zur Freilegung der Begleitstoffe 48
IX. Darstellung von Invertinlösungen 50
B. Über die Adsorption des Invertins und Elution aus dem Adsorbat 55
I. Theoretischer Teil 55
II. Verhalten des Invertins in den Hefeauszügen gegen Kaolin 61

Digitized by Google

Seite

III. Adsorption des Invertins durch Aluminiumhydroxyd 64
1. Beständigkeit des Invertins in Acetonlösung . . 64
2. Selektive Adsorption 66
3. Bestimmung des Invertins im Adsorbat 70
4. Beständigkeit des Invertins im Adsorbat . . . 74
5. Fraktionierte Adsorption 75
IV. Elution des Invertins aus dem Tonerdeadsorbat . . 77
1. Elution mit verschiedenen Mitteln 77
2. Einfluß der Koadsorbentien und Koeluentien . . 80
V. Adsorption durch Calciumphosphat und Elution . . 84
VI. Adsorption des gereinigten Invertins durch Kaolin und Elution 85
VII. Zur Dialyse der Invertinlösungen 88
VIII. Verhalten der Invertinlösungen gegen Uranylacetat 91
C. Invertinpräparate 94
I. Einleitung 94
II. Verfahren der Adsorption mit Aluminiumhydroxyd . 95
1. Fraktionierte Adsorption 95
2. Vollständige Adsorption 98
3. Verarbeitung gealterter Autolysenflüssigkeit . . 99
III. Adsorption mit Kaolin 99
IV. Über Reinheitsmerkmale und Beständigkeit . . . 102
Anhang: Versuchsbelege 108

A. Über die Lösung des Invertins aus der Hefe.

I. Probleme bei der Darstellung von Invertinlösungen.

Die Darstellung einer Enzymlösung aus der Hefe ist keine präparative Aufgabe von der Art wie die Isolierung eines frei oder an Säure gebunden vorkommenden Alkaloids oder Farbstoffs aus einem Pflanzenmaterial. Der Zellinhalt des Hefepilzes ist nicht nur ein aus hochmolekularen organischen Körpern zusammengesetztes Gemisch, dessen Komponenten durch richtig gewählte Lösungsmittel, saure oder alkalische Reagenzien, freigemacht und ausgezogen werden können. Das ist wirklich der Fall bei anderen enzymatischen Ausgangsstoffen, die uns die Natur darbietet. In Bestandteilen der Pflanze, Wurzeln, Blättern und Samen, kommen Enzyme gebunden

Digitized by Google

vor, nämlich in Form von Adsorbaten, die sofort die Enzyme freigeben, wenn man die Adsorptionsaffinitäten mit geeigneten Mitteln überwindet. Zum Beispiel liefern die süßen oder bitteren Mandeln beim Ausziehen nach den Vorschriften der Literatur wenig Emulsin; nach einer unveröffentlichten Untersuchung von R. Willstätter und W. Csányi kann man aber mit verdünnten Alkalien rasch fast die ganze Menge des vorhandenen Emulsins freilegen und in Lösung bringen. Ähnlich verhält es sich mit einem Vorkommen der Peroxydase, die sich in den Keimlingen der Getreidearten reichlich findet. Sie geht fast nicht in wäßrige Lösung; behandelt man aber nach Beobachtungen von R. Willstätter und A. Pollinger die Keimlinge mit natriumbicarbonathaltigem Wasser, so wird sofort die gesamte Peroxydase frei und geht in den wäßrigen Auszug. Diese Mittel versagen bei dem Pilz. Die Enzyme sind mit Bestandteilen der Hefezellen so fest assoziiert, daß ihr Löslichwerden den Abbau der Eiweißkörper und noch anderer hochmolekularer Stoffe zur Voraussetzung hat.

Die Hefe ist ein Lebewesen von sehr veränderlicher Zusammensetzung. Daher ist der Versuch aussichtsreich, den H. v. Euler[1]) mit seinen Mitarbeitern und J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper[2]) unternahmen, sie durch geeignete Züchtung und Ernährung invertinreicher zu machen. Es ist aber auch möglich, wie im folgenden gezeigt wird, in der abgetöteten Hefe Invertinbildung hervorzurufen, so daß die Auszüge viel mehr, sogar manchmal das Doppelte an Invertin vom angewandten Pilz enthalten.

Das Hauptproblem bei der Darstellung von Enzymlösungen, z. B. von Invertin aus Hefe, stellen die post-

[1]) H. v. Euler u. O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 269 (1919); 106, 201 (1919); über die älteren Versuche von Euler siehe hier S. 213; O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 65 (1920).

[2]) Biochem. Ztschr. 54, 108 u. 122 (1913); J. Meisenheimer u. L. Semper, Biochem. Ztschr. 67, 364 (1914).

Digitized by Google

mortalen enzymatischen Vorgänge dar, welche die Freilegung durch Löslichwerden des Invertins und zugleich unvermeidlich das Löslichwerden und in Lösung gehen der Begleitstoffe zur Folge haben. Das Invertin ist, wie sich im folgenden ergeben wird, in der Hefe entweder örtlich geschützt oder es ist durch chemische Bindung oder durch Adsorptionsaffinität an unlösliche Körper verankert, vielleicht der Kohlehydrat- oder der Proteinklasse. Es ist aber nicht wahrscheinlich, daß die Freilegung des Invertins in unlösbarem Zusammenhang steht mit dem allgemeinen enzymatischen Protoplasmaabbau bei der Selbstauflösung der Hefe. Diese postmortalen Vorgänge können in der mannigfaltigsten Weise geleitet und beeinflußt werden. Die Aufgabe ist, sie so zu leiten, daß die größte Menge von Invertin in Lösung gebracht wird, zusammen mit solchen Begleitstoffen, welche die Reinigung und Isolierung des Enzyms am wenigsten stören.

Die totale Autolyse der unverdünnten Hefe, eine der seit C. O'Sullivan und F. W. Tompson[1]) meist angewandten Methoden zur Enzymgewinnung, bringt einen zu großen Ballast von mehr oder weniger abgebauten Eiweißkörpern und Kohlehydraten in die Flüssigkeit. Wird die Hefe, mit Wasser verdünnt, bei Gegenwart eines antiseptischen Mittels sich selbst überlassen, so wandert unter diesen Bedingungen partieller Autolyse das Invertin rascher in wäßrige Lösung, so daß die Auflösung der Begleitstoffe herabgemindert wird. Noch mehr werden die endotryptischen Vorgänge hintangehalten durch Ausziehen mit ammoniakalischem Wasser; die Exosmose des Invertins ist noch mehr abgekürzt, seine Begleiter sind in diesem Fall wenig abgebaute Eiweißkörper der Hefe; gerade dieser Umstand hat aber die Invertinlösungen für einen in dieser Arbeit angewandten Gang der Reinigung zunächst minder geeignet gemacht. Die von der

[1]) Journ. chem. soc. 57, 834 (1890).

Digitized by Google

Hefe abgetrennten Enzymlösungen stellen keine fertigen Produkte dar, sondern in ihnen nehmen enzymatische Reaktionen ihren Fortgang; das Altern scheint die Invertinlösungen zu verbessern, indem die höheren Proteine in niedrigere umgewandelt werden können.

Auch die Lehre von S. P. L. Sörensen[1]) von der Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen ist für diese präparative Arbeit von Bedeutung. Es ist zu berücksichtigen, daß die Hefeenzyme nicht einer für sie unerträglichen Reaktion des Mediums ausgesetzt werden. Zum Beispiel läßt sich die Hefemaltase, die bisher aus Frischhefe nicht extrahiert werden konnte, vollständig in Lösung überführen[2]), wenn man die entstandene Säure neutralisiert, die beim Abtöten der Hefe durch Toluol langsam, durch Chloroform rasch als Produkt enzymatischer Vorgänge gebildet wird. Diese Säure ist am gefährlichsten, weil am konzentriertesten, am Ort ihrer Entstehung, in der Hefezelle selbst.

Ferner hat die Wahl des Antiseptikums auf die Enzymisolierung großen Einfluß. Bei Gegenwart von Toluol wird die Invertinausbeute hoch, bei Gegenwart von Essigester sehr gering. Dieses abtötende Mittel schädigt zwar gar nicht das Invertin, aber es unterdrückt die enzymatischen Abbauvorgänge, durch die das Invertin löslich wird. Auch der Kohlehydratabbau ist von den antiseptischen Mitteln abhängig; die Menge des in Lösung gehenden Hefegummis ist groß bei Gegenwart von Toluol, gering mit Chloroform.

Die Lösungen des Invertins lassen sich nicht nach ihrem Gehalt an Invertin allein beurteilen, wenn man darauf ausgeht, das Enzym weiter zu reinigen. Die invertinreichsten Auszüge, die mit ammoniakalischem

[1]) Biochem. Zeitschr. 21, 131 (1909).

[2]) R. Willstätter, Tr. Oppenheimer u. W. Steibelt, Ztschr. f. physiol. Chem. 110, 232 (1920); R. Willstätter und W. Steibelt, Ztschr. f. physiol. Chem. 111, 157 (1920).

Digitized by Google

Wasser bei Gegenwart von Toluol entstehen, sind nicht gut dafür anwendbar infolge der starken Adsorptionsfähigkeiten der nach der üblichen Ausfällung von Eiweiß noch vorhandenen zu wenig abgebauten Begleitstoffe. Die Züchtung der Hefe könnte die präparative Arbeit außer durch Vermehrung des Invertins auch durch Verminderung des Ballastes von störenden Begleitstoffen, also durch Verbesserung der Enzymlösungen unterstützen.

Die quantitative Analyse der Enzymlösungen reicht zur Beurteilung nicht aus, aber sie ist die leitende Methode. Die präparative Arbeit vom Pilz bis zum Enzym in Substanz wird durch die quantitative Analyse geleitet, und zwar in zwei verschiedenen Beziehungen: hinsichtlich der Ausbeute im Verhältnis zum Ausgangsmaterial (Menge–Zeit–Quotient des Invertins) und hinsichtlich des Reinheitsgrades (Zeitwert des Invertins) in den Hefeauszügen und Invertinpräparaten.

II. Bestimmung von Invertin in den Auszügen; Maße für Konzentration und Ausbeute.

Die Bestimmung beruht auf den Arbeiten von C. O'Sullivan und F. W. Tompson[1]), C. S. Hudson[2]), S. P. L. Sörensen[3]), L. Michaelis[4]) und besonders H. v. Euler.[5]) Die Menge des Invertins wird durch die Reaktionsgeschwindigkeit der Rohrzuckerspaltung bei p_H-Optimum gemessen, die in weiten Grenzen der Enzym-

[1]) Journ. chem. soc. 57, 834 (1890).

[2]) Journ. Am. chem. soc. 30, 1160 und 1564 (1908).

[3]) Biochem. Ztschr. 21, 131 und zwar 256 (1909).

[4]) L. Michaelis u. H. Davidsohn, Biochem. Ztschr. 35, 386 (1911); L. Michaelis u. M. M. Menten, Biochem. Ztschr. 49, 333 (1913); L. Michaelis, Biochem. Ztschr. 60, 91 (1914).

[5]) H. v. Euler, E. Lindberg u. K. Melander, Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 152 (1910); H. v. Euler u. S. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 335 (1911); H. v. Euler u. O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 269 (1919).

Digitized by Google

menge proportional ist.[1]) Die Geschwindigkeit wird ebenso wie durch die Konstante der monomolekularen Reaktion auch ausgedrückt durch die Zeit bis zu einem bestimmten Grad der Spaltung. Während H. v. Euler und O. Svanberg[2]) in ihren letzten Arbeiten andere Maße einführten (Aktivitätszahl, Inversionsfähigkeit), ziehen wir es vor, in dieser Untersuchung den anschaulichen und am genauesten bestimmbaren Ausdruck, die Zeit bis zur 0-Drehung, anzuwenden. Da unter geeigneten Bedingungen der Invertinwirkung k annähernd konstant gefunden wird, so kann der Zeitwert[3]) aus der logarithmischen Kurve mit wenigen Messungen oder einer einzigen entnommen werden, mindestens für den Bereich von 30—80 Proz. Spaltung.

Der Invertingehalt wird daher gemäß der Eulerschen Definition[4]) durch die Zeit t in Minuten gemessen, die 0,05 g getrocknete Hefe oder der dieser Menge entsprechende Auszug oder 0,05 g Präparat brauchen, um bei 15,5° 4 g Rohrzucker in 25 ccm Lösung, die 1 Proz. NaH_2PO_4 enthält, zu 75,75 Proz. zu spalten, nämlich so weit, daß nach Aufhebung der Multirotation die Drehung für $D = 0°$ ist. Der Minuten- oder Zeitwert des Invertins ist, da er sich auf gleiche Trockengewichte (0,05 g) bezieht, das Maß seiner Konzentration (z. B. in der Hefe) und seines Reinheitsgrades (z. B. im fertigen Präparate). Für die Extrakte werden die Zeitwerte auf die ver-

[1]) C. S. Hudson, Journ. Am. chem. soc. **30**, 1160 (1908); H. v. Euler u. O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269 und zwar 275 (1919).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 209 und zwar 273 (1919); O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65 und zwar 83 (1920).

[3]) Zwischen diesem Zeitwert und der bei derselben Temperatur bestimmten Konstanten besteht die Beziehung $k = \frac{0{,}6153}{t}$ [vgl. H. v. Euler u. S. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 15 (1911)].

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 160 (1910); **73**, 336 (1911); **107**, 273 (1919).

Digitized by Google

arbeiteten Hefen (Invertin aus 0,05 g wasserfreier Hefe) bezogen, so daß sie ein Maß der Ausbeute darstellen („Zeitwert bezogen auf Hefe"; $\frac{\text{Zeitwert der Hefe}}{\text{Zeitw. d. Extr. b. a. H.}} \cdot 100$ = Ausbeute). Man kann auch die Zeitwerte der Invertinlösungen auf ihre Trockengewichte beziehen (auf 0,05 g Trockenrückstand), um sie als Maß der Invertinkonzentration dienen zu lassen („Zeitwert bezogen auf Trockengewicht"). Um auch die Enzymmengen (und bei den Präparaten die Ausbeute) zu bestimmen und zu vergleichen, werden nach dem Vorbild des Menge-Wert-Produktes[1]) der Peroxydase (des Peroxydasewertes)[2]), mit derselben Absicht wie O. Svanberg[3]) den Gesamtsaccharasegehalt durch die monomolekulare Reaktionskonstante multipliziert mit dem Totalvolumen der Lösung definiert, zwei Ausdrücke eingeführt: *Menge–Zeit–Produkt* und *Menge–Zeit–Quotient.* Ersteres ist die Zeit, die zur Inversion des Rohrzuckers bis auf 75,75 Proz. erforderlich wäre, wenn die gesamte Enzymmenge unter den angegebenen Bedingungen auf 4 g Rohrzucker in 25 ccm einwirken würde. Der Menge–Zeit–Quotient (M.Z.Q.) ist der reziproke Wert, ist Enzymmenge in einer konstanten willkürlich gewählten Gewichtseinheit ausgedrückt, nämlich der Quotient des in Form von Hefe, Extrakt oder Präparat gewogenen (bzw. abgemessenen) Materials und seiner durch den Minutenwert gemessenen Wirkungszeit. Dieser Wert, der Enzymmenge direkt proportional, ist additiv; den Summen verschiedener Invertinmengen entsprechen die Summen ihrer Menge–Zeit–Quotienten.

Ausführung. Die pufferhaltige Zuckerlösung bringen wir mit etwa so viel Invertinlösung auf 100 ccm, daß die Hydrolyse zur Nulldrehung 60—180 Minuten erfordert.

[1]) R. Willstätter u. A. Stoll, diese Annalen **416**, 21 und zwar 28 (1918).

[2]) R. Willstätter, diese Annalen **422**, 47 und zwar 49 (1920/21).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65 und zwar 83 (1920).

Digitized by Google

Zwischen 50 und 75 Proz. Spaltung wird die Reaktion durch Eintragen von 25 ccm in ein mit 5 ccm 2-n-Soda beschicktes Reagierglas sistiert, das mindestens 15 Min. im Thermostaten von 20° bleibt.

Die Berechnung geschieht nach O'Sullivan und Tompson, nur mit dem Unterschied, daß der Nullwert bei 75,75 Proz. Spaltung liegt gegenüber 74,1 Proz. der englischen Forscher, da wir α_D bestimmen gegenüber α_j bei O'Sullivan und Tompson, die mit dem „jaune moyen" von Biot[1]) arbeiteten. Die mit den angegebenen Proben ermittelten Nulldrehungszeiten und die daraus berechneten Minutenwerte sind im Intervall von 50 bis 80 Proz. Spaltung mindestens auf ± 2 Proz. genau (möglicher Fehler) bestimmt; den Hauptfehler, dem gegenüber die Versuchsfehler verschwinden, bedingen die Abweichungen der Reaktionskurve von der logarithmischen.

Ein Beispiel der Verarbeitung von Hefe soll die Anwendung und die Bedeutung der Maße anschaulich machen. In der Tabelle 1 ergibt sich aus den Minutenwerten 329 und 0,86 für das Präparat eine gegen vierhundertfache Invertinkonzentration im Vergleich zur Hefe und aus dem Rückgang des M.Z.Q. von 109,8 auf 9,18 eine Invertinausbeute von 8,37 Proz. der Theorie.

III. Bestimmung des Invertins in der Hefe.

Auf der Bestimmung des Invertins der frischen Hefe beruhen die Ausbeuteangaben bei der Darstellung von Invertinlösungen und Präparaten.

Nach James O'Sullivan[2]) hat H. v. Euler[3]) gemeinsam mit seinen Schülern die Kinetik des Invertins

[1]) Siehe H. T. Brown, G. H. Morris u. J. H. Millar, Journ. chem. soc. 71, 72 und zwar 86 (1897).

[2]) Journ. chem. soc. 61, 593, 926 (1892).

[3]) H. v. Euler u. S. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 14 und zwar 20 (1911); 73, 85 und zwar 93 (1911); H. v. Euler u. O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 105, 187 und zwar 194 u. 211 (1919); 106, 201 und zwar 214 (1919); H. v. Euler u. R. Blix, Zeitschr. f. physiol. Chem. 105, 83 und zwar 88 u. 106 (1919).

Digitized by Google

Tabelle 1.

Beispiel für die Maße der Konzentration und Ausbeute.

Enzymmaterial	Menge	Nulldrehungszeit (Min.)	Zeitwert b. a. Hefe	Zeitwert b. a. Trockengew.	Menge–Zeit–Produkt	Menge–Zeit–Quotient	Ausbeute (Proz.)
Brauereihefe, 20prozentig	9,0 kg	164,5 f. 0,5 g Hefe	329	329	0,00912 [1])	109,8	100
Der gebildete Hefeauszug, filtriert gedacht . . .	—	190 f. 1,25 ccm	340	—	—	—	96,5
Der im Versuch gewonnene Hefeauszug	20,3 L.	190 f. 1,25 ccm	—	—	0,0117	85,5	78,0
Invertinlösung gereinigt mit Tonerde	10,10 L.	168 f. 2,5 ccm	—	—	0,0415	24,1	21,9
Invertinlösung weiter gereinigt mit Kaolin . .	1100 ccm	237 f. 0,5 ccm	—	—	0,108	9,26	8,45
Invertinpräparat	0,383 g	17,2 f. 0,0025 g	—	0,86	0,109	9,18	8,37

[1]) Beispiel für die Berechnung von M.Z.P.: $\frac{164{,}5 \cdot 0{,}5}{9000}$.

Digitized by Google

in der frischen Hefe gründlich untersucht und sowohl im monomolekularen Verlauf der Reaktion wie in der Proportionalität von Wirkung und Menge weitgehende Übereinstimmung zwischen lebender Hefe und Invertinlösungen festgestellt. Es bedingte keinen erheblichen Unterschied, ob mit oder ohne abtötende Mittel wie Toluol oder Chloroform gearbeitet wurde. Im Versuch ohne Antiseptikum macht sich die Gärung in der kurzen Zeit und bei der niederen Temperatur wenig bemerkbar. Und bei der Abtötung der Hefe ist es ohne Einfluß, daß durch Toluol eine allmähliche, durch Chloroform eine rasche Säureproduktion in der Hefezelle hervorgerufen wird. Während eben dieser Umstand die Bestimmung der Maltase[1]) in der Hefe immer gehindert hat, wird die Invertinreaktion, für die ein Bereich von p_H 3,8 bis 5,0 günstig ist, durch die auftretende Säure nicht gestört. Merkwürdigerweise macht sich keine Hinderung der Diffusion der gelösten Stoffe durch die Zellwand bemerkbar; die Biose und auch der zur Einstellung der optimalen Wasserstoffzahl erforderliche Puffer, der in diesem Falle freilich eine viel weniger wichtige Aufgabe wie bei der Maltase oder überhaupt keinen Einfluß hat, gelangt so rasch an den Reaktionsort in der Zelle, daß das Invertin in der Hefe ebenso wirkt wie in wäßriger Lösung. Wird im Gange der Bestimmung die Zuckerlösung mit der Zentrifuge von der Hefe getrennt, so geht die Inversion in ihr nicht weiter; also verläßt kein Anteil des Invertins die Hefezelle während der Reaktion, wie auch schon J. O'Sullivan[2]), sowie H. v. Euler und S. Kullberg[3]) gefunden haben.

Es ist indessen noch nicht bewiesen, daß wirklich die beobachtete Invertinwirkung die maximale ist, daß die gesamte Invertinmenge in der frischen Hefe zur

[1]) R. Willstätter u. W. Steibelt, Zeitschr. f. physiol. Chem. 111, 157 (1920).

[2]) Journ. chem. soc. 61, 593 (1892).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 29 (1910).

Digitized by Google

Wirkung gelangt. H. v. Euler[1]) begründet die Zuverlässigkeit der Invertinbestimmungen in Hefe folgendermaßen: „Mit der gleichen Menge ein und derselben Hefe wird nämlich unter übereinstimmenden äußeren Bedingungen (Temperatur, Acidität usw.) die gleiche Invertasewirkung erzielt, unabhängig davon, ob die Zellen durch Trocknen entwässert wurden oder durch Toluol bzw. Chloroform an Zuwachs und Gärtätigkeit gehemmt wurden, oder ob die Hefe frisch zur Anwendung kam." Da es uns aber gelingt, bei der Exosmose des Invertins aus der Hefe unter gewissen Bedingungen anwachsende Invertinwirkung zu beobachten (siehe Abschnitt VI), so durften wir die Neubildung des Enzyms in der abgetöteten Hefe nicht für sicher halten, ohne die Bestimmung darauf nachzuprüfen, ob sie den maximalen Wert ergibt.

Die Bestimmung führen wir stets unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition aus, da Abänderungen, wie sie in den Eulerschen Untersuchungen häufig vorkommen, den Vergleich erschweren. 2,00 g frische Hefe, deren Trockengewicht bestimmt wird, suspendieren wir in Wasser und bringen unter Zusatz von Puffer und gewöhnlich von etwas Toluol mit 16 g Zucker auf 100 ccm. Zur Sistierung der Hydrolyse (in 25 ccm mit 5 ccm Soda) zeigt sich, wie J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper[2]) beobachtet haben, die Soda bei der Hefe nicht ausreichend; man muß möglichst rasch von ihr abfiltrieren.

Die als Ausgangsmaterial für unsere Präparate angewandte Hefe der Löwenbrauerei in München war infolge der ungünstigen Versorgung der bayerischen Bierbrauereien im Enzymgehalt schwankend und gewiß nicht besonders günstig. Die Invertingehalte blieben zurück hinter den von H. v. Euler und S. Kullberg[3]) in mittelguten schwedischen Brauereihefen bestimmten (Minutenwert 140). In den umfassenden neueren Untersuchungen

[1]) H. v. Euler u. R. Blix, Zeitschr. f. physiol. Chem. 105, 88 (1919).
[2]) Biochem. Ztschr. 54, 122 und zwar 142 (1913).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 14 und zwar 29 (1910).

Digitized by Google

von H. v. Euler und O. Svanberg[1]) über „Saccharasegehalt und Saccharasebildung in der Hefe" wurde für zwei im Stockholmer Laboratorium seit 1911 bzw. 1917 bearbeitete Hefen bemerkenswerte Konstanz der Saccharasewirkung bei gleicher Vorbehandlung festgestellt. Indessen arbeiteten Euler und Svanberg[2]) in präparativem Maßstab auch mit Hefen von viel ungünstigerem Invertingehalt; bei ihren Darstellungen von Invertin nach Anreicherung des Enzyms in der Hefe war der Minutenwert der Ausgangshefe 400 und wurde durch ihre Vorbehandlung mit Zucker und Ammonphosphat auf 90 gesteigert.

Hefe der Löwenbrauerei in München.

November 1918 . .	276
Dezember 1918 . .	300, 340
Mai 1919	295, 328, 318, 355
Juni 1919	305, 327, 350, 437
Juli 1919	400, 390, 380, 310
August 1919 . . .	350, 330, 328
Oktober 1919 . . .	340, 280, 328, 280, 312, 236, 306, 380, 274

Sechswöchentliche Gärpause in den Brauereien.

Dezember 1919 . .	450, 603
Januar 1920 . . .	245, 235
Februar 1920 . . .	230

Um zu prüfen, ob die Invertinwirkung der Hefe beim Zerstören der Zellstruktur ansteigt, zerrieben wir die Hefe aufs gründlichste mit Seesand. In derselben Absicht hat schon J. O'Sullivan[3]) eine Reihe von Versuchen angestellt. Er zerrieb ohne Sand; nach Verreiben der Hefe mit Wasser, wobei viele Zellen zerrissen wurden, stimmte die Invertinwirkung mit der von unversehrter Hefe überein. Durch Verreiben frischer Hefe ohne Zusatz von Wasser wurde die Invertinwirkung wesentlich geschwächt. Die Erklärung dafür liegt zum

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **106**, 201 (1919).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269 (1919); O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65 (1920).

[3]) Journ. chem. soc. **61**, 926, 932 (1892).

Digitized by Google

Teil in der Austrocknung der Hefe beim Zerreiben unter diesen Umständen; trockne Hefe entfaltet unter den Bedingungen der Invertinbestimmung in Frischhefe nicht die volle enzymatische Wirkung. In unseren Versuchen ließ das mikroskopische Bild keine unversehrte Hefezelle mehr erkennen; die Invertinwirkung war durch das Zerreiben nicht beeinflußt (Tabelle 2). Das nämliche zeigt sich beim Behandeln mit flüssiger Luft, wobei die Zellwände nicht zerrissen, die Hefe aber verflüssigt wurde.

5,00 g Hefe wurden mit 10 g Seesand in einer matten Porzellanreibschale 30—45 Minuten unter Zusatz von etwas Toluol sehr kräftig zerrieben. Das Gemisch wurde dann in einen mit 125 ccm 32 prozentiger Zuckerlösung beschickten 250 ccm-Meßkolben übergespült, genau entsprechend den gewöhnlichen Bestimmungsbedingungen. Dabei war das Volumen des Seesandes in Rechnung zu setzen, was eine kleine Ungenauigkeit mit sich brachte. Da nach dem Sistieren mit Soda die Filtration auf Schwierigkeiten stieß, wurden unter Einhaltung der Bestimmungsbedingungen 100 ccm mit Talk und spanischer Klärerde geschüttelt und auf einer Nutsche durch eine Talkschicht über Filtrierpapier abgesaugt. So erhielt man sehr rasch klare Lösungen für die Polarisation.

Tabelle 2.

Invertinwirkung frischer und zerriebener Hefe.

	Minutenwert der frischen Hefe	Minutenwert der zerriebenen Hefe
1. Versuch (Anh. Nr. 1) . . .	350	352
2. Versuch (Anh. Nr. 2)		
a) sofort	310	314
b) nach 2 Tagen bestimmt .	—	308
3. Versuch (Anh. Nr. 3) . . .	312	310
4. Versuch (Anh. Nr. 4)		
a) sofort	340	390
b) nach 3 Tagen bestimmt .	—	355

Digitized by Google

Getrocknete Hefe. H. v. Euler und S. Kullberg[1]) hatten früher bei der vorsichtigen Entwässerung der Hefe einen Rückgang der Invertinwirkung auf etwa die Hälfte beobachtet. Später äußerte sich Euler[2]) dahin, daß durch die Trocknung der Enzymgehalt nicht beeinflußt werde.

Es fehlte bisher ein Verfahren, das Invertin in getrockneter Hefe zu bestimmen, was für die gewöhnlichen Trockenhefen[3]) schwieriger ist als bei Frischhefe. Hefe, die drei Tage an der Luft getrocknet worden, gab beim Extrahieren unter Zusatz von Toluol 83 Proz. des Invertins an die wäßrige Lösung ab (Anhang Nr. 26); in gemahlenem Zustande ergab sie unter den Bedingungen der Frischhefeanalyse nur $^2/_3$ der zu erwartenden Invertinwirkung (Anhang Nr. 5).

Die Bestimmung gelang annähernd durch gründlichstes Verreiben mit Seesand; für 1 g Hefe wurden 10 g Seesand angewandt, $^1/_2$—1 Stunde reichte nicht (vgl. Tabelle 3), die Werte stiegen bis zu etwa zweistündigem Verreiben an. Auch dabei wurden die theoretischen Werte nicht mit Sicherheit ganz erreicht. Bei den am vorsichtigsten getrockneten Hefen gibt es gewiß Differenzen (Versuch 1 und 2 der Tabelle 3), die kaum der Methode zur Last zu legen sind.

Es darf aber gefolgert werden, daß die Hefe bei verschiedenartigen Trocknungen keine Änderung des Invertingehaltes und auch keine Schädigung der enzymatischen Einrichtung erleidet, die beim Extrahieren

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 85 und zwar 95 (1911).

[2]) H. v. Euler und P. Lindner, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, Leipzig 1915, Seite 87; H. v. Euler und R. Blix, Zeitschr. f. physiol. Chem. **105**, 83 und zwar 107 (1919).

[3]) Das Verkleben der Hefezellen wird am besten bei der Krausetrocknung vermieden; Proben von derartig getrockneten Hefen verdankten wir der Freundlichkeit des Herrn Prof. Dr. Oppenheimer.

Digitized by Google

die Freilegung und das Löslichwerden des Invertins herbeiführt (Abschnitt VI). Trocknung bei 100° wird entgegen den Literaturangaben[1]) nicht vertragen (vgl. Abschnitt IV).

Tabelle 3.

Invertinbestimmung in getrockneter Hefe.

	Trocknung	Minutenwert der frischen Hefe	Bestimmung mit getrockn. Hefe, 1/2 Std. mit Sand zerrieben		Bestimmung mit getrockn. Hefe, länger zerrieben		
			Minutenwert	Proz.	Minutenwert		Proz.
1. Versuch (Anh. Nr. 6)	im Luftstrom von 20°	288	475	60	1 1/2 Stdn. zerr.	342	84
2. Versuch (Anh. Nr. 7)	mit absol. Alkohol, mit Äther gewaschen	236	290	81	2 1/2 Stdn. zerr.	278	85
3. Versuch (Anh. Nr. 8)	lufttrocken	306	360	85	2 Stdn. zerr.	308	100
4. Versuch (Anh. Nr. 9)	im Luftstrom von 55°	236	308	77	2 1/2 Stdn. zerr.	250	95

IV. Kritik der Methoden zur Isolierung aus der Hefe.

1. Das Wesen des Lösungsvorganges.

Die Methoden zur Darstellung von Invertinlösungen aus Hefe unterscheiden sich wesentlich darin, ob der Zellinhalt ohne enzymatischen Abbauvorgang von den Zellwänden, von den festen und unlöslichen Bestandteilen der Zelle abgetrennt oder ob er durch enzymatische Reaktionen chemisch verändert wird, ehe man ihn von den Hefeüberresten entfernt.

[1]) Nach E. Buchner [Ber. d. d. chem. Ges. 30, 1110, 1113 (1897)] wird Invertin „der 1 Stunde auf 145° erhitzten Hefe noch in wirksamem Zustand entzogen"; das gilt gewiß nur für einen Bruchteil.

Digitized by Google

Zur Isolierung des Invertins ohne enzymatischen Abbau wird die Hefe entweder zerrieben, mit Wasser angeschüttelt und filtriert (L. Michaelis) oder zerrieben und abgepreßt (J. Meisenheimer). Diese Verfahren zielen darauf hin, durch Zerstörung der Zellstruktur das Invertin, das die lebende Hefe nicht an Wasser abgibt, in Lösung überzuführen. Die Ergebnisse sind stets unbefriedigend, weil sich das Invertin in solchem geschützten Zustande oder derart mit hochmolekularen organischen Verbindungen vergesellschaftet vorfindet, daß es nicht wasserlöslich ist. Die Methode läßt sich nur dadurch brauchbar gestalten, daß man mit viel größerer Versuchsdauer, z. B. durch lang fortgesetztes Verreiben, wobei die große Konzentration des Zellinhaltes und die gelinde Erwärmung durch das Reiben den enzymatischen Prozeß beschleunigt, das Wesentliche der Methode aufgibt und sie der Methode, Invertinlösungen durch enzymatischen Abbau darzustellen, nähert.

Die Methode, durch enzymatische Abbauvorgänge das Invertin frei und löslich zu machen, läßt sich so gestalten, daß die frische Hefe unverdünnt der langdauernden Autolyse überlassen wird (C. O'Sullivan und F. W. Tompson), oder daß sie dabei unter mäßiger Verdünnung mit Wasser der Wirkung eines antiseptischen und abtötenden Mittels unterworfen wird (C. S. Hudson, rapid autolysis). Nebenumstände, welche die Freilegung des Enzyms verbessern können, sind dabei einerseits die Trocknung, andrerseits die Verflüssigung der Hefe. Außerdem beobachten wir oft als eine Nebenerscheinung des Lösungsvorganges eine Zunahme an Invertinwirkung in der abgetöteten Hefe, somit wahrscheinlich Neubildung des Invertins aus einem Zymogen.

Die Hefeverflüssigung durch abtötende Mittel bedeutet und bewirkt an sich keine Abgabe des Enzyms an Wasser. Und je nach dem dabei angewandten Zellgift werden die enzymatischen Vorgänge verschieden

Digitized by Google

geleitet, so daß nach unserer Auffassung der chemische Apparat der Invertinfreilegung entweder geschont (Toluol) oder geschädigt wird (Essigester); daher ist nur im ersteren Falle die durch Hefeverflüssigung beschleunigte Autolyse für die Invertingewinnung brauchbar. Es zeigt sich, daß im allgemeinen enzymatischen Protoplasmaabbau ein bestimmter, einzeln zu beeinflussender Vorgang enthalten ist, der die Freilegung des Invertins bewirkt.

Somit ist der langsame Übergang des Invertins in Lösung auf seine Lostrennung aus einer besonderen Verankerung entweder durch chemische Bindung oder durch Adsorptionsaffinität oder wahrscheinlicher aus einer besonders geschützten Lage zurückgeführt. Diese Erklärung dürfte auch an die Stelle der Schlußfolgerung zu setzen sein, die vor kurzem O. Svanberg[1]) aus seinen Versuchen über den Lösungsvorgang des Invertins bei der Autolyse von Hefe gezogen hat: „Dem relativ langsamen Übergang des Enzyms aus dem Hefebrei in den Saft entspricht dessen großes Molekulargewicht und langsame Diffusion".

Manches scheint dafür zu sprechen, daß die Bindung des Invertins in der Hefe wie eine chemische ist. Denn an Rohrzuckerlösung wird von der Hefe kein Invertin abgegeben, während wir das Tonerdeadsorbat des Invertins durch Rohrzucker leicht quantitativ zerlegen können (Kapitel B, Abschnitt III, 3).

Die Vorbereitung der Hefe für die Extraktion durch Trocknung ist wertlos, insoweit sie durch Koagulieren der Eiweißstoffe das Lösen des Invertins erleichtern soll. Aber die Trocknung kann die Auflösung des Invertins befördern, zumal die enzymatischen Vorgänge während gewisser Trocknungen stark einsetzen. Die zur Trocknung und Koagulation der Eiweißkörper angewandten hohen Temperaturen (E. Salkowski und

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65, 74 (1920).

Digitized by Google

M. Barth) sind unzulässig. Auch das Koagulieren der Hefeproteine durch Alkohol (W. A. Osborne) ist unnützlich. Trocknung der Hefe und darauffolgendes Ausziehen mit Wasser kann brauchbare Invertinlösungen liefern (W. Donath, E. Fischer, H. v. Euler), wenn Schädigungen (höheres Erwärmen, Verweilen in wasserhaltigem Alkohol) vermieden und das Ausziehen der Hefe, was beachtet werden sollte, unter Bedingungen des enzymatischen Abbaues und mit genügend großer Zeitdauer vorgenommen wird.

Neben den zum Lösen des Invertins nötigen enzymatischen Vorgängen gehen einher proteolytische und amylolytische Vorgänge, die nicht den Invertingehalt, aber die Zusammensetzung und Brauchbarkeit der Invertinlösungen beeinflussen. Temperaturerhöhung beschleunigt die Überführung des Invertins in Lösung, wirkt aber ungünstig auf den Reinheitsgrad der Enzymlösung.

Nach den im folgenden mitgeteilten Erfahrungen ist die beschleunigte Autolyse nach C. S. Hudson (auch schon ohne die weiteren Verbesserungen) das günstigste von den beschriebenen Verfahren; es ist rasch und liefert große Ausbeuten und reinere Lösungen als die anderen Verfahren.

2. *Verhalten lebender Hefe gegen Wasser.*

Wie schon James O'Sullivan[1]) gezeigt hat, gibt gesunde Hefe kein Invertin an Wasser ab. Auch H. v. Euler und O. Svanberg[2]) kamen zu diesem Resultat, als sie Hefe 6 Stunden bei 9° mit fließendem Wasser behandelten. Die Hefe zeigte dann dieselbe „Inversionsfähigkeit" wie zuvor; allerdings könnte Invertinverlust durch Neubildung kompensiert sein. Da E. Salkowski[3]) sein Verfahren, gummifreies Invertin darzustellen, auf

[1]) Journ. chem. soc. **61**, 593 (1892).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **106**, 201, 239 (1919).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 124 und zwar 129 (1909).

Digitized by Google

die vermeintliche Abgabe des Enzyms aus lebender Hefe gründete, so prüften wir in dieser Beziehung das Verhalten frischer Hefe.

Preßhefe wurde ohne besondere Reinigung mit dem 8 fachen Gewicht Eiswasser angerührt. Nach 3 Stunden enthielt das Wasser 3 Proz. (± 2) und nach 45 Stunden (unter Eiskühlung) 5 Proz. (± 2) (Anhang Nr. 10 und 11).

Eine zweite Probe von Brauereihefe rührten wir mit dem doppelten Gewicht Eiswasser an und hielten die Temperatur während des Versuches bei 3—4°. Das Wasser enthielt nach 8 Stunden 1,8 ± 1 Proz. und nach 36 Stunden ebenfalls 1,8 ± 1 Proz. vom Invertin. In diesen Fällen waren die angewandten Hefen nicht frei von abgestorbenen Zellen und die Filtrate nicht ganz klar, sie enthielten eine kleine Anzahl von Hefezellen. Der Versuch bestätigt, daß lebende Hefe kein Invertin abgibt.

Die Hefe des zweiten Versuches gab bei 25—30° unter sonst gleichen Bedingungen in 24 Stunden 10 Proz. ihres Invertins an das Wasser ab, wobei die Hefe schon etwas faulig zu werden begann (Anhang Nr. 12).

3. *Invertinlösung aus kurz zerriebener Hefe.*[1])

Nach L. Michaelis[2]) wird Preßhefe mit Sand verrieben, indessen nicht so vollkommen wie zur Zymasedarstellung (hier $2^1/_2$—3 Minuten für 300 g), und dann 3—6 Stunden mit Chloroformwasser ausgezogen. Wertvoll ist der Vorschlag, die Invertinlösungen mit Kaolin zu klären und von Eiweiß zu befreien. Vollständig gelingt allerdings die Beseitigung der Eiweißkörper auf diesem Wege nicht.

---

[1]) Vgl. Abschnitt VII.

[2]) Biochem. Zeitschr. **7**, 488 (1907/08); L. Michaelis und M. Ehrenreich, Biochem. Zeitschr. **10**, 283, 295 (1908); L. Michaelis in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden (1910) III. Bd. S. 7.

Digitized by Google

Aus den quantitativen Angaben kann man schließen, daß die Extrakte nach Michaelis (Zeitwerte etwa 3000—6000) 5 bis möglicherweise gegen 10 Proz. vom Hefeinvertin enthalten.

Noch ungünstiger ist die Vorschrift von G. Bertrand und P. Thomas[1]), die kurz zerriebenene Hefe $^1/_2$ Stunde lang mit reinem Wasser auszuziehen.

4. *Invertinlösung aus Hefepreßsaft.*

J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper[2]) finden in der Darstellung des Invertins aus dem Buchnerschen Hefepreßsaft den Vorzug großer Schnelligkeit und hoher Enzymausbeuten. Eine Reinigung des an genuinen Eiweißkörpern reichen Präparates, die den Wert um 50—100 Proz. verbessert, wird durch Fällen der Proteine mit Schwefelsäure oder Oxalsäure erzielt. Da quantitative Angaben über die Invertinwirkung des Preßsaftes fehlen, so kann man nur die Bestimmung von O. Svanberg[3]) anführen, der das Verfahren auf seine besonders enzymreichen Hefen anwandte. In diesem Falle enthielt der mit Kaolin gereinigte Hefepreßsaft 5 Proz. vom Invertingehalt der Hefe; das Präparat erreichte den Minutenwert 7,5.

5. *Invertinlösung aus Trockenhefen.*

a) Verfahren von E. Salkowski und M. Barth.[4])

Das Verfahren beruht darauf, daß beim Erhitzen der Hefe auf 100° „das Hefeeiweiß zum weitaus größten Teil in einen im Wasser unlöslichen Zustand übergeht; außerdem aber werden so die Hefezellen zerrissen und

[1]) Guide de Chimie biologique, Paris 1913, S. 306.

[2]) Biochem. Zeitschr. 54, 108 (1913).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 65 und zwar 86 (1920).

[4]) M. Barth, Ber. d. d. chem. Ges. 11, 474 (1878); E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 305 (1901); 61, 124 (1909).

Digitized by Google

das Ferment der lösenden Kraft des Wassers zugänglich gemacht".

Lufttrockene Hefe, die den unveränderten Enzymgehalt der frischen besaß, erwärmten wir auf 100° nur 3 Stunden. Die Bestimmung durch zweistündiges Verreiben ergab (Anhang Nr. 13) nur noch 46 Proz. vom ursprünglichen Invertin.

Für das Extrahieren wurde nach Salkowski und Barth 6 Stunden auf 105—110° erhitzt. Die Ausbeute in der Lösung (die späteren Schädigungen, die das Verfahren bedingt, bleiben außer Betracht) war gering (Tabelle 4). Wichtiger ist hier, daß der Heferückstand vom Filtrieren nach dem dreitägigen Extrahieren des Versuches 3 noch 29 Proz. (Anhang Nr. 18) der ursprünglichen Invertinmenge enthielt, d. i. fast dreimal mehr als die Invertinlösung. Unter denselben Umständen geben die schonend getrockneten Hefen mindestens 60 Proz. des Invertins frei. Das für die Freilegung des Invertins wichtige Enzym hat noch mehr als das Invertin selbst durch das Erhitzen gelitten.

Tabelle 4.

Invertinlösungen aus Trockenhefe von 105°.

	Verfahren des Extrahierens	Minutenwert der Hefe	Minutenwert des Auszuges (bezogen auf Hefe)	Invertinausbeute Proz.
Erste Hefenprobe (Anh. Nr. 14)	a) 22 Stdn. bei Zimmertemp.	ca. 250	16500	ca. 2
	b) 22 Stunden bei 30°		12000	ca. 2
Zweite Hefenprobe (Anh. Nr. 15)	24 Stunden bei 35°	ca. 250	1650	ca. 15
Dritte Hefenprobe (Anh. Nr. 16)	3 Tage bei Zimmertemp.	350	3500	10
Vierte Hefenprobe, zuvor mit Alkohol entwässert (Anh. Nr. 17)	22 Stdn. bei Zimmertemp.	ca. 250	2200	ca. 11

Digitized by Google

b) Verfahren von W. A. Osborne.[1])

Mit ähnlicher Absicht wie das vorige Verfahren, nämlich um vor dem Ausziehen des Invertins die Eiweißkörper zu koagulieren, wurde die Hefe 16—24 Stunden der Einwirkung von Alkohol unterworfen. Eine derartig vorbehandelte Hefe lieferte uns, mit dem gleichen Gewicht Chloroformwasser 7 Tage behandelt, nur etwa 16 Proz. (Anhang Nr. 19) des anfangs vorhandenen Invertins, d. i. nur einen Bruchteil der ohne die Vorbehandlung in Lösung gehenden Menge. Auch die mit Alkohol behandelte Hefe gibt also das Invertin, das noch vorhanden ist, viel schwieriger frei.

c) Invertinlösung aus Acetontrockenhefe.

Entwässert man die Hefe durch kurzes Behandeln mit viel Aceton, so gibt sie das Invertin wieder anormal schwierig an Wasser ab. Im Parallelversuch mit derselben Hefe, an der Luft getrocknet, gingen bei 35° in 24 Stunden 70,5 Proz. des Invertins der Frischhefe in Lösung; aus der fein gemahlenen Acetontrockenhefe nur 17 Proz. und in den folgenden 13 Tagen bei 20° noch weitere 38 Proz. (Anhang Nr. 20). Ein Versuch mit einem zweiten Präparat der Acetonhefe ergab in 24 Stunden bei 35° 23 Proz. Invertinlösung gegenüber 59 Proz., die dieselbe Hefe in lufttrockenem Zustand in Lösung schickte (Anhang Nr. 21)

d) Invertin aus lufttrockener Hefe.

Nach H. v. Euler und B. af Ugglas[2]) soll die Hefe gleich invertinhaltige Auszüge liefern, sei es, daß sie im Vakuum bei Temperaturen bis zu 80°, sei es, daß sie mit überschüssigem Alkohol getrocknet wurde.

Emil Fischers[3]) Verfahren bestand darin, einen Teil lufttrockene Bierhefe (Typus Frohberg, Reinkultur) mit

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 399 (1899).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 279, 282 (1910).

[3]) Ber. d. d. chem. Ges. 27, 2985 (1894); vgl. auch Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 60, 74 (1898).

Digitized by Google

15 Teilen Wasser, dem 1 Proz. Toluol zugefügt war, bei 30—35° unter zeitweisem Umschütteln auszuziehen.

Über die Ausbeute teilt H. v. Euler[1]) in der „Chemie der Hefe" mit: „Über den Grad der Extrahierbarkeit hat Verfasser Versuche angestellt, welche zeigen, daß aus geeignet getrockneten Präparaten der größte Teil der gesamten Enzymmenge gewonnen werden kann. Indessen variiert der extrahierbare Anteil sehr stark mit Typus, Rasse und Vorbehandlung der Hefe."

Eine genauere Angabe von H. v. Euler, E. Lindberg und K. Melander[2]) bezieht sich auf eine rasch und vorsichtig nur mit kurzer Temperatursteigerung auf 100° im Vakuum (also nicht unter den Bedingungen von E. Salkowski) getrocknete Hefe. Das Ausziehen mit der zehnfachen Menge Wasser bei Zimmertemperatur in 20 Stunden lieferte ein Fünftel der durch Autolyse der frischen Hefe in Lösung gebrachten Invertinmenge, d. i. höchstens 15 Proz. des Hefeenzyms. Etwas später gewannen Euler und Kullberg[3]) aus einer solchen Trockenhefe in 12 Stunden die Lösung von einem Viertel ihres Invertingehaltes und einem Achtel des Gehaltes der Frischhefe.

In unseren Versuchen wird die Ausbeute in einem aliquoten Teil des wäßrigen Auszuges ohne Rücksicht auf die abfiltrierbare Menge bestimmt und auf den Zeitwert der betreffenden Frischhefe bezogen. Wir behandelten die Trockenhefe in gemahlenem Zustand mit dem Zehnfachen an Wasser unter Zusatz von Toluol. An der Luft getrocknete Hefen lieferten in 24 Stunden bei 20° ungefähr 70 und 75 Proz. (Anhang Nr. 22 und 23), in 7 Tagen etwa 80 Proz. (Anhang Nr. 22), in anderen Versuchen bei 35° in 24 Stunden etwa 78, ferner 59, 71 und bei Fortsetzung in 8 Tagen 83 Proz. Invertin (Anhang Nr. 24, 25, 26).

[1]) Leipzig 1915, S. 87.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 152, 154 (1910).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 85, 94 (1911).

Digitized by Google

Es zeigt sich, daß sogar die Art und Weise des Trocknens an der Luft von erheblichem Einfluß ist, daß langsame Trocknung für die Freilegung des Invertins günstiger ist als die Fixierung des Protoplasmazustandes durch rasches Entwässern.

	Extraktion	Invertinausbeute
Hefe, durch Liegen an der Luft getrocknet . . .	3 Tage bei 20°	81,5 Proz. (Anh. Nr. 27)
Hefe, in raschem Luftstrom von 20° getrocknet . .	3 „ „ 20°	56 „ („ „ 28)
Hefe ebenso	5 „ „ 20°	68,5 „ („ „ 28)
Hefe, in raschem Luftstrom von 55° getrocknet . .	5 „ „ 20°	70 „ („ „ 29)

6. Invertinlösung durch langsame Autolyse.

Die beste und wichtigste Methode in den Händen der Forscher, die über Invertin eindringender gearbeitet haben, ist die Darstellung von Auszügen nach C. O'Sullivan und F. W. Tompson[1]) durch langsame und vollkommene Autolyse der unverdünnten, scharf abgepreßten Hefe (obergärige Brauereihefe war von ihnen angewandt) ohne Zusatz eines Antiseptikums (oder bei Gegenwart von Toluol) in den Arbeiten von H. v. Euler, E. Lindberg und K. Melander[2]), von H. v. Euler und S. Kullberg[3]), von H. v. Euler und O. Svanberg[4]), von O. Svanberg.[5])

In einem oder in zwei Monaten verwandelte sich Hefe, ohne zu faulen, in ein schweres gelbes Liquidum ohne Gärwirkung, aber mit einer scheinbaren Zunahme an invertierender Wirkung. Von dieser verflüssigten Hefe filtrierten O'Sullivan und Tompson eine klare Lösung, „yeast liquor", die alles Invertin der ange-

[1]) Journ. chem. soc. **57**, 834 (1890).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 152 und 155 (1910).
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 335 (1911).
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269 (1919).
[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65, 72 (1920).

Digitized by Google

wandten Hefe enthielt. O'Sullivan und Tompson[1]) sprachen von einem „apparent increase" des Invertins der Oberhefe beim Stehen; es blieb aber zweifelhaft, ob nicht an dem Befunde die Ungenauigkeit der Invertinbestimmung in Frischhefe schuld trug. Es erschien zwar auch möglich, daß, solange die Hefe sich noch in lebendem Zustand befindet, Bildung von Invertin erfolgt, aber da in der abgestorbenen Hefe der verflüssigten Masse noch ein weiterer Zuwachs einzutreten schien, so legten O'Sullivan und Tompson mehr Gewicht auf die Annahme, daß die Invertinbestimmung in frischer Hefe nicht genügend hohe Werte gab.

Die Methode der klassischen Arbeit ist hauptsächlich in den Untersuchungen H. v. Eulers und seiner Mitarbeiter fruchtbar geworden. Die Abänderungen, die vorgenommen wurden, waren Zusatz eines Antiseptikums, meist Toluol, und eine gewisse Fraktionierung, indem bei Euler und Svanberg der in den ersten vier Tagen gebildete Hefesaft verworfen wurde. Autolyse bei 35° lieferte einen weniger wirksamen Auszug. Den Reinheitsgrad der Autolysenflüssigkeit versuchten Euler und Svanberg mittels der invertinreich gezüchteten Hefe zu steigern. Die Ausbeute an Invertin von O'Sullivan und Tompson ist in den späteren Versuchen, für die übrigens fast immer untergärige Hefe diente, nicht mehr erreicht und Zuwachs nie wieder beobachtet worden. Es ist uns wahrscheinlich, daß der Zusatz von Toluol nicht ohne Einfluß auf den Verlauf der Autolyse und auf eine Enzymbildung ist und daß er in diesem Fall die Freilegung des Invertins nicht begünstigt.

Einen Nachteil bei der praktischen Gewinnung der Hefeflüssigkeit bedeuten nach H. v. Euler und O. Svanberg[2]) die großen Verluste, die dadurch verursacht werden, daß bei der Filtration vom festen Rückstand bei weitem nicht der gesamte Saft gewonnen wird, sondern auf dem Filter ein Brei hinterbleibt, welcher be-

[1]) a. a. O., S. 872.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 277 (1919).

Digitized by Google

deutende Saftmengen enthält. Aus 1 kg frischer Hefe werden nämlich nicht mehr als etwa 300 ccm Saft erhalten, in welchem sich nur $^1/_5$—$^1/_4$ der gesamten Saccharasewirkung der frischen Hefe vorfindet.

Für die Frage des Freiwerdens und des Lösungsvorganges ist interessanter das Verteilungsverhältnis des Invertins zwischen Saft und Rückstand, also die bei idealer Trennung in Lösung befindliche Enzymmenge.

Im oben angeführten Versuch von Euler und Svanberg kann man berechnen, daß sie in der theoretischen Extraktmenge von 700 ccm etwa 50 Proz. betrug. In einem anderen Falle vermochten Euler und Svanberg[1]) aus 15 kg Preßhefe, die 10 Liter Wasser enthielten, in 3140 ccm Auszug 21,5 Proz. des Invertins abzutrennen, woraus sich eine Invertinmenge von 69 Proz. der Frischhefe in der gesamten Hefeflüssigkeit berechnen läßt. Endlich läßt ein letzter Versuch von O. Svanberg[2]) auf den Übergang von 90 Proz. des ursprünglichen Invertins in einen Autolysensaft schließen.

Unsere geringen Erfahrungen mit dieser Methode stimmen mit denen von H. v. Euler überein. Untergärige Brauereihefe von 22 Proz. Trockengewicht blieb unter Zusatz von Toluol 30 Tage der Autolyse überlassen. Die gesamte entstandene Hefeflüssigkeit enthielt 78 Proz. vom Invertin der Hefe. Der Minutenwert der Hefe war nämlich 276, derjenige der Hefeflüssigkeit betrug 355 und der Zeitwert bezogen auf das Trockengewicht des Hefeauszuges war 256 (Anhang Nr. 30).

7. *Invertinlösung durch beschleunigte Autolyse.*

Um das Invertin für die von J. Kjeldahl[3]) und C. O'Sullivan und F. W. Tompson[4]) vorgeschlagene Anwendung in der Clergetmethode der Rohrzuckeranalyse

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 299 (1919).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 81 (1920).
[3]) Compt. rend. Carlsberg Laborat. Kopenhagen **1**, 189 (1881).
[4]) Journ. chem. soc. **49**, 64 (1886) und **59**, 46 (1891).

Digitized by Google

leicht zugänglich zu machen, ersetzte C. S. Hudson[1]) die einen Monat dauernde, langsame Autolyse durch den rascheren Lösungsvorgang, der unter Verflüssigung der Hefe bei der Behandlung mit Zellgiften und wenig Wasser einsetzte. Die Hefe wird mit gleichem Gewicht Wasser angeteigt und mit dem Zwanzigstel ihres Gewichtes an Toluol in einigen Stunden verflüssigt und in 3—5 Tagen so weit autolysiert, daß die Invertinwirkung des Auszuges ihr Maximum erreicht. Da C. S. Hudson die Rohrzuckerhydrolyse unter besonderen Bedingungen mißt (5 ccm Invertinlösung, 50 ccm 9prozentige Saccharoselösung, 30°), bestimmten wir, um eine Brücke zwischen seinen und unseren Wertangaben herzustellen, für eine unserer Invertinlösungen die Wirkung unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition und unter Hudsons Bedingungen. Dem Minutenwert 29 entsprach ein Hudsonscher Wert von 8,7. Die Hefeauszüge von Hudson sind daher ungefähr durch Nulldrehungszeiten für 5 ccm von 19 Minuten (Oberhefe) und von 11,4 Minuten (Unterhefe) zu kennzeichnen, während der beste Hudsonextrakt aus unserer Hefe eine entsprechende Nulldrehungszeit von 24 ergibt.

Von unseren Erfahrungen über die Hudsonsche Methode bezieht sich ein großer Teil auf ein wenig andere Versuchsbedingungen, nämlich doppelt so viel Wasser; wir arbeiteten nach diesem Verfahren anfangs ohne Kenntnis der Abhandlung von Hudson und verließen es nicht, weil die so erhaltenen Invertinlösungen bei der Adsorption und Elution günstige Resultate gegeben hatten. Aber bei der Hefe hat jede Änderung Einfluß. Unter den eigentlichen Bedingungen Hudsons scheint (bei gedachter Filtration) die Ausbeute noch höher zu sein und rascher erreicht zu werden als in größerer Verdünnung. Zum Beispiel unterwarfen wir eine und dieselbe Hefe unter Toluolzusatz der Autolyse a) mit gleichem Gewicht, b) mit dem Zehnfachen an

[1]) C. S. Hudson und H. S. Paine, Journ. Am. chem. soc. **32**, 774 (1910); C. S. Hudson, Journ. Am. chem. soc. **36**, 1566 (1914).

Digitized by Google

Wasser. Nach 5 Tagen enthielten die Auszüge von a) 147 und b) 103 Proz. vom Invertin der Hefe.

Die Invertinlösung nach Hudson, von der die Tabelle 5 einige Beispiele anführt, bietet nicht nur den angestrebten Vorteil der raschen Darstellung, sie liefert auch die besten Ausbeuten. Dies gilt für den gebildeten und auch infolge der guten Filtrierbarkeit für den praktisch gewonnenen Hefeauszug. Es ist nicht ausgeschlossen, daß man auch mit der langsamen Autolyse zu solchen Werten gelangen wird, aber dies ist noch nicht oder nicht mit Sicherheit erreicht.

Tabelle 5.

Invertinlösung durch beschleunigte Autolyse (Zimmertemperatur).

	Dauer der Autolyse	Zeitwert der Hefe	Zeitwert d. Auszugs (bezogen auf Hefe)	Ausbeute in Proz.
a) mit doppeltem Gewicht Wasser.				
Erste Hefe (Anh. Nr. 31)	6 Tage	300	354	85
Zweite Hefe (Anh. Nr. 32)	7 „	212	235	90
Dritte Hefe (Anh. Nr. 33)	5 „	340	298	114
Vierte Hefe (Anh. Nr. 34)	6 „	245	282	87
Fünfte Hefe (Anh. Nr. 35)	11 „	235	252	93
b) mit gleichem Gewicht Wasser.				
Sechste Hefe (Anh. Nr. 36)	3 Tage	297	413	72
Siebente Hefe (Anh. Nr. 37)	3 „	305	368	83
Achte Hefe (Anh. Nr. 38)	3 „	364	280	130
Neunte Hefe (Anh. Nr. 39)	5 „	437	344	127
Zehnte Hefe (Anh. Nr. 40)	3 „	327	380	86
Elfte Hefe (Anh. Nr. 41)	5 „	603	410	147

Digitized by Google

V. Rasche Autolyse unter verschiedenen Bedingungen.

Um die günstigsten Verhältnisse für die abgekürzte Autolyse kennen zu lernen, untersuchten wir den Einfluß der Zeitdauer, der Temperatur und der Reaktion des Mediums durch Bestimmung der Zeitwerte in den Auszügen. Die Bedingungen für die präparative Arbeit werden durch das Verhältnis zwischen den beiden Kurven bestimmt, welche einerseits die Minutenwerte auf Hefe bezogen und andererseits auf Trockengewicht bezogen in ihrer Abhängigkeit von der Versuchsdauer wiedergeben.

Hinsichtlich der Autolysendauer kamen wir zu analogen Ergebnissen wie O. Svanberg[1]) bei der langsamen Autolyse. Unter den Bedingungen 2 Teile Wasser, 1 Teil Hefe gelangen, wie die Tabelle 6 zeigt, die Minutenwerte der Invertinlösungen in etwa 7 Tagen zum Optimum; die Minutenwerte auf Trockengewicht bezogen sind anfangs ungünstiger und sie gestalten sich zu günstigen Endwerten in 4—8 Tagen. Bei höherer Temperatur stieg der Invertingehalt des Auszuges viel rascher an, aber das Verhältnis von Trockenrückstand zur Wirksamkeit scheint ungünstig und die Ausbeute niedrig zu bleiben. Für die Bestimmungen (Anhang Nr. 42) diente dieselbe Hefe, deren Minutenwert 300 betrug.

Tabelle 6.

Beschleunigte Autolyse bei 20° und 36°.

Dauer, Tage	Versuch bei 20°			Versuch bei 36°		
	Zeitwert auf Hefe bezogen	Zeitwert auf Trokkengew. bezogen	Ausbeute Proz.	Zeitwert auf Hefe bezogen	Zeitwert auf Trokkengew. bezogen	Ausbeute Proz.
1	2800	—	11	635	—	47
4	390	188	77	425	300	70,5
6	354	200	85	390	352	77
8	330	—	91	390	—	77

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65, 72 (1920).

Digitized by Google

Die Geschwindigkeit des Lösungsvorganges differiert bei verschiedenen Hefeproben erheblich. Während im Versuch der Tabelle in 1 Tag 11 Proz. vom Invertin der Frischhefe in den Auszug überging, betrug der gelöste Anteil bei einer anderen Hefelieferung (beide im November 1918) 36 Proz. Nach 4 Tagen Versuchsdauer glichen sich die Unterschiede aus (Anhang Nr. 43).

In der Wärme ist diese Autolyse nicht anwendbar zum Lösen des Invertins. Bei 50,0° gingen in zwei Versuchen nur 8,3 und 8,9 Proz. des Invertins in den Auszug über (Anhang Nr. 44 und 45).

Einen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Autolyse kann man durch Einstellen schwach alkalischer Reaktion z. B. mit Ammoniak ausüben. Dadurch werden, wie der Vergleich der Invertinauflösung bei 0° und 20° in der Tabelle 7 erkennen läßt, nicht nur die Adsorptionsverhältnisse im Zellinhalt und die Permeabilität der Zellwand geändert. Vielmehr sind die Unterschiede zwischen den Ausbeuten bei niederer und höherer Temperatur (wie auch schon in der Tabelle 6) dadurch zu erklären, daß die Auflösung des Invertins auf einer Enzymwirkung beruht. Die Freilegung des Invertins verläuft bei Anwendung von Ammoniak schon bei 0° nicht wesentlich langsamer wie sonst bei Zimmertemperatur. Übrigens wird in der schwach ammoniakalischen Flüssigkeit die Endotryptasewirkung[1]) sehr gehemmt; es geht infolgedessen in den ammoniakalischen Extrakt eine große Menge von unabgebautem Eiweiß über.

Für die Versuche der Tabelle 7 wurden von jeder Hefeprobe zwei Ansätze mit Ammoniak allein und zwei Parallelversuche mit Ammoniak und Diammonphosphat geprüft. Die Preßhefe schüttelten wir mit dem gleichen

[1]) Vgl. M. Hahn und M. Geret in E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, München 1903, S. 287, 319.

Digitized by Google

Gewicht Wasser und 5 Proz. ihres Gewichtes an Toluol an und titrierten sie mit Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion; der Zusatz von sekundärem Ammonphosphat betrug 2 Proz. der Frischhefe.

Tabelle 7.

Neutralextraktion bei 0° und 20°.

	Zeitwert der Hefe	Versuche bei 0°		Versuche bei 20°	
		Zeitwert d. Invertinlösung auf Hefe bezogen	Ausbeute Proz.	Zeitwert d. Invertinlösung auf Hefe bezogen	Ausbeute Proz.
Erste Hefeprobe (Anh. Nr. 46)	355	1870	19	920	38,6
Dieselbe mit Phosphat	—	1870	19	560	63,5
Zweite Hefeprobe (Anh. Nr. 47)	328	2190	15	913	35,8
Dieselbe mit Phosphat	—	2075	15,8	713	46
Dritte Hefeprobe (Anh. Nr. 48)	318	2240	14	400	78
Dieselbe mit Phosphat	—	2450	12,7	390	80

Die Differenzen zwischen gleichartigen Versuchen sind bei Anwendung von Ammoniak größer als sonst; zum Teil sind sie bedingt durch die verschiedene Art des Zusatzes von Ammoniak. Die ganzen Ammoniakmengen, die zur Neutralisation der entstehenden Säure nötig waren, wurden entweder anfangs auf einmal hinzugefügt oder vorsichtig in einzelnen Anteilen entsprechend dem Gang der Säurebildung in der Hefe. Aus dem Vergleich in der Tabelle 8 geht hervor, daß das letztere Verfahren der Neutralextraktion rascher wirkt als die Gegenwart des nötigen oder überschüssigen Ammoniaks vom Versuchsbeginn an.

Digitized by Google

Tabelle 8.

Gang der Invertinauflösung bei raschem und langsamem Neutralisieren.

	Temp.	(Ausbeute in Proz.)		
		24 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.
Hefe, rasch ammoniak. (Anh. Nr. 46)	20°	38,6	79	140
Hefe, rasch ammoniak. (Anh. Nr. 47)	25°	35,8	66	—
Hefe, langs. ammoniak. (Anh. Nr. 49)	12°	60	122	—
Hefe, langs. ammoniak. (Anh. Nr. 48)	25°	78	—	87,5
Hefe, langs. ammoniak. (Anh. Nr. 50)	15°	—	112	112

Der Zusatz von Diammonphosphat beim Neutralverfahren bedeutet keine Verbesserung für den Fall der allmählichen Neutralisation. Wohl wird aber bei gesamtem Zusatz des Ammoniaks von Versuchsbeginn an die störende Wirkung des anfangs überschüssigen Alkalis, wie die Tabelle 9 zeigt, aufgehoben vom Phosphat, das hier als Puffer wirkt.

Tabelle 9.

	rascher Ammoniakzusatz		langsamer Ammoniakzusatz
	1. Hefe (Anh. Nr. 46)	2. Hefe (Anh. Nr. 47)	3. Hefe (Anh. Nr. 48)
ohne Phosphat . .	38,6	35,8	78,5
mit Phosphat. . .	63,5	46	80

Dagegen ist die Auflösung des Invertins unter den Bedingungen von Hudson mit Zusatz nur von Diammoniumphosphat (Hefe mit gleichem Gewicht Wasser, 5—10 Proz. Toluol und 2,5 Proz. der Frischhefe an

Digitized by Google

Phosphat) mindestens so günstig wie das Neutralextrahieren mit Ammoniak. So entstanden nämlich Invertinlösungen (Tabelle 10) mit Zeitwerten, die zu den günstigsten bisher beobachteten zählen.

Tabelle 10.

Invertinlösung durch beschleunigte Autolyse mit Phosphatzusatz.

	Dauer	Zeitwert der Hefe	Zeitwert d. Invertinlösung	Ausbeute Proz.
Erste Hefe (Anh. Nr. 51)	3 Tage	315	300	105
Zweite Hefe (Anh. Nr. 52)	3 „	288	357	81
Dritte Hefe (Anh. Nr. 53)	5 „	250	191	131
Vierte Hefe (Anh. Nr. 54)	5 „	312	155	205

Auch der Zusatz von Calciumcarbonat zum Autolysenansatz nach Hudson wirkt günstig, nicht ebenso brauchbar scheint Magnesiumoxyd zu sein.

Das Neutralisationsverfahren hat für die Auflösung des Invertins die Bedeutung, daß die bei der Hefeabtötung durch das Zellgift sich bildenden Säuren unschädlich gemacht werden. Wenn sie auch dem Invertin nicht schaden, so erfolgt doch die Freilegung desselben besser in neutralem als in schwach saurem Medium, was den Vorgang von den endotryptischen Reaktionen bei der Hefeautolyse unterscheidet. Daher finden wir im allgemeinen (siehe die Tabelle 11), daß die Gewinnung der Invertinlösungen, wenn es sich nur um den Enzymgehalt, nicht um Brauchbarkeit für die Reinigung mit Adsorptionsmitteln handelt, unter Neutralisation günstiger ist als unter den genauen Bedingungen der beschleunigten Autolyse von Hudson.

Digitized by Google

Tabelle 11.

Rasche Autolyse mit und ohne Ammoniak.

	Dauer	Hefe-zeit-wert	a) nach Hudson		b) mit Ammoniak-zusatz	
			Zeitwert d. Inver-tinlös. auf Hefe bezogen	Invertin-ausbeute Proz.	Zeitwert d. Inver-tinlös. auf Hefe bezogen	Invertin-ausbeute Proz.
Erste Hefe (Anh. Nr. 55) bei b) mit doppelter Wassermenge	3 Tage	297	413	72	270	110
Zweite Hefe (Anh. Nr. 56)	3 „	ca. 240	240	ca. 100	240	ca. 100
Dritte Hefe (Anh. Nr. 57) bei b) mit doppelter Wassermenge	3 „	305	368	83	390	78,5
Vierte Hefe (Anh. Nr. 58) bei b) mit doppelter Wassermenge	5 „	363	280	130	223	164
Fünfte Hefe (Anh. Nr. 59) bei a) mit doppelter Wassermenge	3 „	240	282	87	268	90

VI. Invertinbildung in abgetöteter Hefe.

Bei der beschleunigten Autolyse fanden wir, wie die Versuche im vorigen Abschnitt und im folgenden zeigen, öfters in den Auszügen mehr Invertinwirkung als in den angewandten Hefen. Unter 27 auf rasche Autolyse verarbeiteten Hefeproben ergab die Verarbeitung von 14 Proben Zuwachs an Inversionsvermögen. Gewöhnlich waren es Hefen von schlechtem Invertingehalt, die diese Erscheinung zeigten. Nur in zwei von den Zuwachsfällen hatte die Ausgangshefe einen günstigeren Zeitwert als 300, während in 10 von den 13 Fällen der Extraktion ohne Zunahme die angewandte Hefe bessere Minutenwerte als etwa 300 aufwies.

Die Zunahme an Invertinwirkung ist entweder durch die Beseitigung oder Abschwächung eines Hemmungskörpers oder durch die postmortale Bildung des Enzyms aus einer inaktiven Vorstufe, einem Zymogen, zu erklären.

Digitized by Google

Die Annahme, daß beim Abtrennen der Autolysenflüssigkeit mit den Heferückständen ein Hemmungskörper beseitigt wird, verliert an Wahrscheinlichkeit durch Versuche, in denen wir ohne Abtrennung eines Extraktes Zunahme an invertierender Wirkung feststellten. 2 g Hefe wurden unter wechselnden Bedingungen mit Wasser und Zellgift stehen gelassen und dann zusammen mit der umgebenden Flüssigkeit für dieselbe Bestimmung verwendet, wie sie im Abschnitt III für Frischhefe beschrieben wurde. Das Ergebnis schien mehr von der Beschaffenheit der Hefe als von den Versuchsbedingungen abzuhängen.

1. Versuch. Hefe vom Zeitwert 280 ergab nach 2tägigem Stehen mit 2 ccm Wasser, Toluol und 0,04 g Diammonphosphat den Minutenwert 295, also 95 Proz. des Invertins (Anhang Nr. 60).

2. Versuch. Hefe vom Zeitwert 603 ergab, mit 2 ccm Wasser und Toluol versetzt, nach 45 Minuten den Zeitwert 568, nach 1 Tag 535, entsprechend 106 und 112 Proz. Ausbeute (Anhang Nr. 61).

3. Versuch. a) Hefe vom Zeitwert 245 wurde 5 Tage mit 2 ccm Wasser und 0,2 ccm Toluol stehen gelassen. Der Zeitwert war dann 195.

b) Mit 2 ccm Wasser und mit Essigester sowie Toluol und 0,05 g Diammonphosphat versetzt; ebenfalls nach 5 Tagen wurde gefunden: Zeitwert 194 (Anhang Nr. 62).

In beiden Fällen betrug die Invertinwirkung 125 Proz. von der ursprünglichen.

Beim Zerreiben der frischen Hefe pflegt eine derartige Vermehrung der enzymatischen Wirksamkeit nicht einzutreten, denn die Bestimmungen mit zerriebener Hefe waren gute Bestätigungen der Invertinbestimmung in frischer Hefe. Als aber die Hefe vom 2. Versuch, eine besonders invertinarme (Minutenwert 603) Hefe (17. Dezember 1919 von der Brauerei nach mehrwöchentlichem Stilliegen des Gärbetriebes geliefert) mit der zwei- bis

Digitized by Google

dreifachen Menge Seesand 2 Stunden kräftig zerrieben und mit Wasser $^1/_2$ Stunde geschüttelt wurde, lieferte sie 119 Proz. ($\pm$ 4) des ursprünglichen Invertins (Anhang Nr. 67).

Da man nie eine Hemmung des Invertins, günstige Wasserstoffzahl vorausgesetzt, gefunden hat, wird die einfachere Erklärung den Vorzug verdienen, daß die Zunahme an Invertinwirkung mit Invertinbildung aus einem Zymogen gleichbedeutend ist. Dann bedeuten die Beobachtungen, daß die Hefezelle oft nur fertiges Invertin enthält und öfters neben dem fertigen in untergeordnetem Masse eine Vorstufe desselben.

VII. Über die Freilegung des Invertins.

Das Verhalten der unter verschiedenen Bedingungen an der Luft oder in der Wärme getrockneten und der mit Aceton entwässerten oder mit Alkohol vorbehandelten Hefe und die Abhängigkeit des Lösungsvorganges von der Temperatur ließ vermuten, daß der Auflösung des Invertins ein enzymatischer Prozeß vorausgehe. Da bei der durch Zusatz von Ammoniak abgeänderten Hudsonschen Methode der Abbau der Eiweißkörper durch Endotryptase gehemmt, die Auflösung des Invertins aber befördert wird, so ist die Freilegung des Invertins wahrscheinlich eine einzelne, getrennt von den Hauptvorgängen der Autolyse verlaufende, andere Wasserstoffionenkonzentration erfordernde Reaktion. Sie verläuft glatt in neutralem Medium und wird durch Säure beeinträchtigt. Das Invertin freilegende Enzym scheint gegen Säure ähnlich empfindlich zu sein wie Maltase, sogar noch empfindlicher. Nach einer Arbeit von R. Willstätter und W. Steibelt[1]) gelingt es, die Maltase der frischen Hefe quantitativ zu bestimmen durch rasche Verflüssigung mit Essigester, Neutralisieren der gebildeten Säure und Einwirkung auf Maltose unter Pufferzusatz.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 111, 157 (1920).

Digitized by Google

Aber unter denselben Bedingungen, die für die Maltase noch erträglich sind, leidet die Einrichtung für die Freilegung der Maltase[1]) und der Saccharase. Auch bewirkt für die Freilegung der Zusatz von gefälltem Calciumcarbonat einen weniger wirksamen Schutz als für die Maltase selbst.

Die Beobachtungen sind mit der herrschenden Annahme[2]) unvereinbar, daß das Invertin anders als Zymase nach der Abtötung der Hefe frei liege. Am deutlichsten sprechen für einen örtlichen Schutz oder für eine Verankerung des Invertins an eine unlösliche Komponente, nicht so sehr für eine wirkliche chemische Bindung als eher für einen Adsorptionszustand, die Löslichkeit des Invertins beim Verreiben der Hefe und die Lösungserscheinungen bei Anwesenheit verschiedener Zellgifte.

a) Löslichkeit des Invertins der zerriebenen Hefe.

Es ist unbekannt, wie es sich mit der Löslichkeit des Invertins frischer Hefe beim Zerreiben verhält, nur der Invertingehalt in der zerriebenen Hefe selbst war bisher geprüft. Nun erweist sich der lösliche Anteil des Invertins, der nach sichtlicher Verletzung der Zellstruktur rasch in Lösung gebracht werden kann, als überraschend klein (Tabelle 12). Der unmittelbar lösliche Anteil stellt auch das Maximum dessen dar, was in den Hefepreßsaft übergeht. Neben diesem auffallen-

[1]) Nach unveröffentlichten Versuchen von Willstätter und Steibelt.

[2]) O. Svanberg und H. v. Euler, Fermentforschung 4, 90 (1920), drückten vor kurzem, als sie den hemmenden Einfluß von Kupfersulfat auf die Autolyse der Hefe und die Auflösung des Invertins untersuchten, ihre Anschauung folgendermaßen aus:

„Diesen Effekt des Kupfersalzes könnte man etwa damit erklären, daß die Abscheidung des Enzyms mit einem enzymatischen Vorgang verknüpft ist, der vom Kupfer gehemmt wird. Indessen deuten — wie der eine von uns mehrfach hervorgehoben hat — zahlreiche andere Tatsachen darauf hin, daß die Saccharase in der lebenden Hefezelle zum großen Teil schon in freiem Zustand vorkommt."

Digitized by Google

den Ergebnis treten die differierenden Einzelheiten der Versuche an Bedeutung zurück. Natürlich erschienen die Versuche durch den physiologischen Zustand der Hefe stark beeinflußt. Es spielt auch die im vorigen Abschnitt behandelte postmortale Neubildung des Invertins mit herein, worauf das abweichende Ergebnis des schon oben besprochenen Versuchs 5 der Tabelle 12 zurückzuführen ist.

Die Hefe wurde mit verschiedenen Mengen Seesand kräftig zerrieben und mit verschiedenen Mengen Wasser (mit dem doppelten bis zehnfachen Gewicht) gleich lange ($^1/_2$ Stunde) ausgelaugt. Obwohl nach dem mikroskopischen Bilde die Verletzung der Hefezellen rasch gelingt, wird die Invertinausbeute im Filtrat sehr klein, wenn man nur darauf ausgeht, die Hefezelle zu zerreißen und sie steigt, wenn mit größerer Sandmenge energisch zerrieben wird.

Tabelle 12.

Lösbares Invertin in zerriebener frischer Hefe.

Nummer	Versuchsanordnung	Dauer des Verreibens	Zeitwert der Hefe	Zeitwert der filtr. Invertinlös. auf Hefe bezogen	Invertin im Filtrat in Proz.
1. (Anh. Nr. 63)	100 g Hefe mit 50 g Seesand u. 200 ccm Wasser	$^1/_2$ Std.	258	1950	13
2. (Anh. Nr. 64)	50 g Hefe mit 50 g Seesand				
	a) mit 100 ccm Wasser	a) $^1/_2$ Std.	330	1280	26
	b) „ 500 „ „	b) 1 Std.	—	1080	31
3. (Anh. Nr. 65)	50 g Hefe mit 50 g Seesand u. 200 ccm Wasser	$^3/_4$ Std.	350	690	51
4. (Anh. Nr. 66)	25 g Hefe mit 50 g Seesand u. 250 ccm Wasser				
		a) $^3/_4$ Std.	285	375	76,5
		b) $2^1/_2$ Stdn.	—	365	78
5. (Anh. Nr. 67)	10 g Hefe mit 25 g Seesand u. 100 ccm Wasser	2 Stdn.	603	505	119

Digitized by Google

Auch beim Zerreiben getrockneter Hefe unter Befeuchten ist der rasch mit Wasser lösbare Anteil gering (unten Versuch 1 und 2a), was in Anbetracht der Schwierigkeit zu erwarten war, die ja schon die Invertinbestimmung in getrockneter Hefe ohne Extrahieren geboten hat. Bei langer Dauer des Zerreibens der befeuchteten Trockenhefe steigt nicht nur der überhaupt bestimmbare, sondern auch der rasch extrahierbare Anteil bedeutend an; während des Zerreibens dürfte sich mehr und mehr die enzymatische Freilegung vollziehen.

	Dauer des Zerreibens	liefert im Auszug Invertin
1. Hefe, im Luftstrom von 33° getrocknet (Anh. Nr. 68) . .	1/2 Std.	33 Proz.
2. Hefe, mit Alkohol und Äther getrocknet (Anh. Nr. 69) . .	a) 1/2 Std. b) 1 1/2 Stdn.	56 „ 71 „
3. Hefe, durch Liegen an der Luft getrocknet (Anh. Nr. 70) . .	2 Stdn.	91 „
4. Hefe, im Luftstrom von 55° getrocknet (Anh. Nr. 71) . .	2 Stdn.	78 „

b) Löslichkeit des Invertins nach Hefeverflüssigung durch verschiedene Zellgifte.

C. S. Hudson[1]) bewirkte die rasche Autolyse durch Verflüssigung der Hefe mit verschiedenen abtötenden Mitteln wie Chloroform, Äther, Toluol, Essigester, Aceton. Bei seiner Darstellung der Invertinlösung erzielte Hudson eine bedeutende Verbesserung der invertierenden Wirkung im Extrakt, als er das anfangs angewandte Chloroform durch Toluol ersetzte. In einer Fußnote erwähnte er, daß die Anwendung von Essigester, obwohl derselbe nach den amerikanischen Patenten 785733 und 785734 besonders geeignet sein soll, um die Inhaltsstoffe der Hefe herauszulösen, zu sehr schwachen Invertinlösungen führe.

[1]) Journ. Am. chem. soc. **36**, 1566, 1568 (1914).

Digitized by Google

In der Tat ist die Löslichkeit des Invertins bei der Abtötung der Hefe mit verschiedenen Mitteln merkwürdig ungleich. Seine Löslichkeit scheint desto geringer zu sein, je rascher das Zellgift die Verflüssigung der Hefe bewirkt hat. Dieses Verhalten ist nicht erklärt worden; es wird kaum anders zu verstehen sein, denn als eine Beeinflussung des enzymatischen Vorganges der Invertinfreilegung. Die Freilegung des Invertins wird durch gewisse Zellgifte nicht nur gehemmt, sie wird verhindert. Denn wenn wir die mit Essigester eingeleitete rasche Autolyse nach Abtrennung der Flüssigkeit unter Anwendung von Toluol fortsetzen, so wird kein Invertin mehr in Lösung gebracht, obwohl das Enzym noch unversehrt in den Heferückständen enthalten ist. Auch nach Verreiben der Hefe wird beim Befeuchten mit Essigester kein weiteres Invertin löslich. Die Unlösbarkeit des Invertins bei Anwesenheit von Essigester braucht dennoch nicht auf einer spezifischen Giftwirkung zu beruhen, sondern bei der Abtötung der Hefe setzt Säurebildung ein, bei Toluol langsam, rasch bei Essigester, während Chloroform zwischen beiden steht. Nur bei der Hefeverflüssigung mit Toluol kommt es, da die Säure langsam auftritt und zugleich wegdissoziiert, zu keiner bedeutenden und für die Freilegung gefährlichen Säurekonzentration. Es war daher möglich, Invertin doch auch bei Verflüssigung der Hefe mit Essigester in guter Ausbeute zu gewinnen, wenn durch Neutralisation mit Ammoniak oder anderen Mitteln die bei der Abtötung gebildete Säure unschädlich gemacht wurde.

Versuche mit Essigsäureäthylester.

Preßhefe verwandelt sich beim Vermischen mit etwas Essigester innerhalb einer oder in wenigen Minuten in einen dünnen Brei. Auch wenn die Hefe zuerst mit dem gleichen Gewicht Wasser angeschüttelt wurde, so erfolgt auf Zusatz von Essigester (10 ccm auf 100 g Hefe) in einigen Minuten schon deutliche und mit der

Digitized by Google

Zeit rasch fortschreitende Verflüssigung, während der Zustand merklicher Verflüssigung bei Chloroform in einer halben Stunde, bei Toluol erst in 2—3 Stunden erreicht wurde.

Zur Extraktion wurde die Hefe mit dem gleichen Gewicht Wasser und dann mit Essigester versetzt und zwar bei den späteren Versuchen der Tabelle 13 immer mit 10 ccm auf 100 g, während bei den ersten Versuchen Differenzen in den Essigestermengen vorkamen, die möglicherweise nicht ohne Einfluß waren. Abgesehen von den ersten Versuchen war der Essigester immer besonders gereinigt und kam neutral reagierend zur Anwendung. Die Tabelle 13 zeigt, daß die Ausbeute bei der Essigesterautolyse durch verschiedene Neutralisationsmethoden oft, aber nicht durchwegs gesteigert werden konnte.

Tabelle 13.

Invertinlösung durch rasche Autolyse unter Zusatz von Essigester.

Hefeprobe	Versuchsanordnung	Zeitwert der Hefe	Invertinausbeute im Filtrat (in Proz.)	
			nach 3 Tagen	nach 5 Tagen
1. (Anh. Nr. 72)	Essigester, sauer reagierend	ca. 140	ca. 28	ca. 37
2. (Anh. Nr. 73)	Essigester, neutral reagierend	305	6,6	—
3. (Anh. Nr. 74)	a) mit sauer reagierendem Essigester	363	44,7	—
	b) mit neutral reagierendem Essigester	—	53	—
	c) mit allmähl. NH_3-Zusatz neutral gehalten	—	82	71
4. (Anh. Nr. 75)	unter Zusatz von 5 g $CaCO_3$ auf 100 g	417	76	—
5. (Anh. Nr. 76)	a) unter Zusatz von 5 g MgO auf 100 g	400	10	15
	b) unter Neutralisieren mit NH_3	—	17	31

Digitized by Google

Hefeprobe	Versuchsanordnung	Zeitwert der Hefe	Invertinausbeute im Filtrat (in Proz.)	
			nach 3 Tagen	nach 5 Tagen
6. (Anh. Nr. 77)	a) mit 3,3 g $KHCO_3$ auf 100 g	410	26	24
	b) ebenso, unter Durchleiten von CO_2	—	36,2	35
	c) unter Neutralisieren mit NH_3	—	14,7	16
7. (Anh. Nr. 78)	unter Neutralisieren mit NH_3	350	48,5	—
8. (Anh. Nr. 79)	unter Zusatz von 2,5 g $(NH_4)_2HPO_4$	327	50	—
9. (Anh. Nr. 80)	a) ohne Zusatz	603	—	10
	b) mit der 10 fachen Menge Wasser	—	—	12
10. (Anh. Nr. 81)	ohne Zusatz	285	—	5
11. (Anh. Nr. 82)	a) ohne Zusatz	245	—	8,5
	b) mit der 10 fachen Menge Wasser	—	—	7,5

In den nach der Essigesterautolyse abfiltrierten Heferückständen ermittelten wir unter den üblichen Bedingungen der quantitativen Bestimmung, so wie wenn es frische Hefe wäre, das Invertin. Obwohl man so gewiß nicht den wahren Betrag des vorhandenen Enzyms bestimmen kann, waren die gefundenen Invertingehalte noch groß (Tabelle 14). Mit diesen Heferückständen setzten wir nun die Autolyse bei Gegenwart von Toluol lange fort und zwar so, daß die mit Essigester autolysierte und ausgewaschene Hefe mit gleich viel Wasser, wie der erste Auszug enthielt, aufgeschlemmt und mit 10 Proz. Toluol versetzt wurde. Aus der letzten Reihe der Tabelle 14 geht hervor, wie wenig Invertin bei dieser weiter geführten Autolyse noch in Lösung gebracht werden kann.

Digitized by Google

Tabelle 14.

Invertinlösung durch sukzessive Autolyse mit Essigester und Toluol.

Hefeprobe	Dauer der weiteren Autolyse mit Toluol	Invertinlösung mit Essigester bezogen auf die frische Hefe Proz.	Invertin in den Hefe-rückständen nach Essigesterautolyse Proz.	Invertinlösung durch fortgesetzte Autolyse mit Toluol Proz.
Nr. 2 der Tab. 13 (Anh. Nr. 73)	2 Tage	6,6	—	< 2
Nr. 1 der Tab. 13 (Anh. Nr. 72)	—	ca. 37	ca. 25	—
Nr. 7 der Tab. 13 (Anh. Nr. 78)	3 Tage	48,5	16	8
Nr. 6 der Tab. 13 (Anh. Nr. 77)	—	16	125	—
Nr. 10 der Tab. 13 (Anh. Nr. 81)	4 Tage	5	74	2
Nr. 11a der Tab. 12 (Anh. Nr. 82)	10 Tage	8,5	74	4
Nr. 11b der Tab. 13 (Anh. Nr. 82)	10 Tage	7,5	76	3
Zerriebene Hefe Nr. 2 der Tab. 15 (Anh. Nr. 65)	4 Tage	45	70	2

Versuche des Zerreibens und darauffolgender Behandlung mit Essigester.

Der Zustand, in dem das Invertin im Augenblick der Abtötung des Pilzes vorhanden ist, läßt sich durch geeignete Behandlung mit Essigester fixieren, während bei Gegenwart von Toluol weiter das unlösliche Invertin in lösliches übergeht. Dazu stimmt auch die Löslichkeit des Invertins nach dem Zerreiben der Hefe. Unsere Versuche, bei Gegenwart der verschiedenen Antiseptika zu autolysieren, schlossen sich an die Prüfung der Extrahierbarkeit beim Verreiben an. Von den Hefeproben der Versuche 1 und 3 der Tabelle 12 verrieben

Digitized by Google

wir je 50 g mit 50 g Seesand entsprechend jenen Versuchen 30 und 45 Minuten lang und versetzten den Brei mit 100 ccm Wasser und 10 ccm von Essigester oder anderem Zellgift, um ihn 4 Tage lang der Autolyse zu überlassen.

War die Hefe reichlich lang genug zur Verletzung der Zellstruktur mit Sand zerrieben, so löste sich doch nur ein Teil des Invertins rasch in reinem Wasser, bei Gegenwart von Essigester auch bei langer Dauer nicht mehr (Tabelle 15), bei Gegenwart von Toluol viel mehr. Durch mehrere Stunden dauerndes kräftiges Zerreiben wurde, wie oben gezeigt, die Menge des rasch löslichen Invertins gesteigert; auch dann lieferte längere Autolyse mit Essigester keinen Zuwachs an löslichem Invertin.

Tabelle 15.

Lösbarkeit des Invertins aus zerriebener Hefe bei der Autolyse mit Essigester oder Toluol.

Nr.	Versuch	Dauer des Zerreibens	Ausbeute an sofort löslichem Invertin Proz.	Ausbeute in viertägiger Autolyse mit Essigester Proz.	Ausbeute in viertägiger Autolyse mit Toluol Proz.
1. (Anh. Nr. 63)	Vers. 1 von Tab. 12 . .	1/2 Std.	13	19	92
2. (Anh. Nr. 65)	Vers. 3 von Tab. 12 . .	3/4 „	51	45	103
2. (Anh. Nr. 66)	Vers. 4b von Tab. 12 . .	2 1/2 Std.	78	71	—

Versuche mit Essigester–Toluol-Mischung.

Die vom Essigsäureester bei der Auflösung des Invertins hervorgerufene Schädigung war vermindert (Tab. 13) beim Neutralisieren der auftretenden Säure; sie wird ganz vermieden, wenn man bei der Einwirkung auf die Hefe außerdem den Essigester mit dem gleichen Volumen Toluol verdünnt. Auch unter diesen Umständen wird rasch weitgehende Verflüssigung der Hefe erreicht.

Digitized by Google

Je 300 g Hefe wurden mit 300 ccm Wasser unter Zusatz von 15 ccm Toluol und 15 ccm Essigester mit oder ohne Puffer, dessen Menge meistens 2,5 Prozent von der Hefe betrug, angeschüttelt und nach 3—5 Tagen filtriert.

Durch diese rasche Autolyse bei Gegenwart von Ammoniumphosphat und Essigester + Toluol gewinnen wir die invertinreichsten Auszüge (Tabelle 16); indessen scheint in diesen Versuchen kein erheblicher Vorteil auf der Gegenwart von Essigsäureester neben Toluol zu beruhen.

Tabelle 16.

Invertinlösung mit Ammonphosphat-Essigester-Toluol.

Versuchsanordnung	Zeitwert der Hefe	Zeitwert der Invertinlösung	Ausbeute mit Essigester-Toluol Proz.	Ausbeute im Vergleichsversuch mit Toluol allein Proz.
Erste Hefe, mit Ammonphosphat, 3 Tage . . . (Anh. Nr. 83)	315	300	105	105
Zweite Hefe, mit Ammonphosphat, 5 Tage . . . (Anh. Nr. 84)	312	143	219	205
Dritte Hefe, mit Ammonphosphat, 3 Tage . . . (Anh. Nr. 85)	310	187	166	—
Dieselbe, mit Natriumphosphat, 3 Tage	—	195	160	—
Vierte Hefe, mit Ammoniak, 3 Tage . . . . (Anh. Nr. 86)	410	326	126	—
Fünfte Hefe, mit Calciumcarbonat[1]), 3 Tage . . (Anh. Nr. 87)	350	525	66,5	—

[1]) Mit Toluol allein (siehe Abschnitt V) wirkt Calciumcarbonat günstiger als bei der rascheren Verflüssigung mit Essigester-Toluol.

Digitized by Google

Tabelle 17.

Rasche Autolyse unter Anwendung von Chloroform.

Nr.	Versuchsanordnung	Zeitwert der Hefe	Invertinlösung mit Chloroform		Invertinlösung mit Toluol	
			Zeitwert auf Hefe bez.	Ausbeute Proz.	Zeitwert	Ausbeute Proz.
1. (Anh. Nr. 88)	Hefe ohne Zusatz, 3 Tage	363	545	66,6	280	130
2. (Anh. Nr. 89)	Hefe ohne Zusatz, 3 Tage	327	1090	30	380	86
3. (Anh. Nr. 90)	Hefe 100 g mit 5 g Calciumcarbonat, 3 Tage . . .	417	650	64	300	140
4. (Anh. Nr. 91)	Hefe ohne Zusatz, 3 Tage	ca. 360	1200	ca. 30	—	—
	Dieselbe mit Ammonphosphat, 3 Tage	—	515	ca. 70	—	—
5. (Anh. Nr. 92)	Hefe ohne Zusatz, 3 Tage	ca. 360	1200	ca. 30	—	—
	Dieselbe mit Ammonphosphat, 3 Tage	—	462	ca. 78	—	—
6. (Anh. Nr. 93)	Hefe mit Ammonphosphat, 5 Tage	288	293	98,5	357	85
7. (Anh. Nr. 94)	Hefe mit Ammonphosphat, 5 Tage	250	260	96	191	131
8. (Anh. Nr. 95)	Hefe mit Ammonphosphat, 5 Tage	312	189	165	153	205

Digitized by Google

Versuche mit Chloroform.

Nach C. S. Hudson liefert die rasche Autolyse bei Gegenwart von Chloroform viel geringere Invertinausbeute als mit Toluol. Da wir diesen Unterschied, den die Versuche 1 und 2 der Tabelle 17 bestätigen, auf die Schädigung des invertin-freilegenden Enzyms zurückführen, so suchen wir ihn durch Neutralisieren der bei der ziemlich raschen Hefeabtötung entstehenden Säure zum Verschwinden zu bringen. Mit Calciumcarbonat gelingt es nicht, weil dieses nicht in die Hefezelle gelangt. Dagegen bewirkt Ammoniumphosphat, von dem wir 2,5 g auf 100 g Hefe anwenden, daß das Invertin mit hoher Ausbeute in Lösung geht (Tabelle 17, Nr. 6 bis 8), wenn auch meist nicht in ebenso hoher wie bei Anwendung von Toluol.

VIII. Zur Freilegung der Begleitstoffe.

Die Begleitstoffe des Invertins, die den Gang der Reinigung, namentlich die Adsorption des Enzyms und seine Elution aus dem Adsorbat beeinflussen, gehen aus der Hefe ebensowenig durch einfache Extraktion hervor, wie das Invertin selbst. Vielmehr spielen auch hier enzymatische Abbauvorgänge eine große Rolle, und es lassen sich sogar in dem allgemeinen Wirrsal des Protoplasmaabbaues einzelne enzymatische Vorgänge bestimmen, leiten und unterdrücken, die gewisse Begleitstoffe in die Lösung überführen.

Soweit es sich um Begleitstoffe aus der Klasse der Eiweißkörper im weitesten Sinne handelt, wurde im vorausgehenden schon angedeutet, daß das Invertin der Autolyse von O'Sullivan und Tompson und der raschen Autolyse nach Hudson von vielen Reaktionsprodukten des Eiweißabbaues durch Endotryptasen, von Peptiden und Aminosäuren, begleitet wird, und daß es arm an genuinen Proteinen oder frei von ihnen ist. Die Unterdrückung der Endotryptase im Verfahren der Neutralextraktion (mit Ammoniak oder Ammonium- bzw. Natriumphosphat)

Digitized by Google

lieferte uns dagegen an höher molekularen Eiweißkörpern reiche, an abgebauten arme Invertinlösungen. Das Verhalten des Invertins in den bei saurer Reaktion und in den bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion dargestellten Auszügen ist so verschieden, daß es nicht möglich ist, für die im Kapitel B beschriebene Reinigung mit Aluminiumhydroxyd den Extrakt nach Hudson durch die schönen, invertinreichen, bei neutraler Reaktion gebildeten Hefeauszüge zu ersetzen.

Die nach der Autolyse von den Heferückständen abfiltrierten Invertinlösungen ändern beim Stehen ihre Zusammensetzung. Das gilt namentlich für die nach Hudson dargestellten, sauer reagierenden Hefeflüssigkeiten. In ihnen setzt sich die Proteolyse fort. Bei langem Stehen beobachtet man zunehmendes Auskrystallisieren einfacher Aminosäuren und Hand in Hand Abnahme der beim Verdünnen mit Aceton ausfallenden, koagulierbaren Eiweißkörper. Solche gealterte Invertinlösungen zeigten das günstigste Verhalten bei der Reinigung nach der Adsorptionsmethode, so daß wir daraus allein durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution mit Ammoniak Invertin vom Minutenwert 1 erhielten.

Noch wichtiger ist ein im voranstehenden noch nicht erwähnter anderer Begleitstoff, über dessen Bedeutung für das Invertin die Ansichten am weitesten auseinandergehen, der Hefegummi. H. v. Euler und O. Svanberg, die in der Darstellung von Invertin hohen Reinheitsgrades am erfolgreichsten waren, kamen vor kurzem bei der Reinigung von Invertin durch Dialyse und bei seiner Analyse zu dem Resultat[1]), daß sich die von Euler und und A. Fodor[2]) früher geäußerte Hypothese von der chemischen Verwandtschaft zwischen Saccharase und Hefegummi auch heute aufrecht erhalten lasse. Auch bei unserem Verfahren der Reinigung mit Aluminiumhydroxyd (Kapitel B, III und C, II) folgt der Hefegummi

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 175 (1920).

[2]) Zeitschr. f. Physiol. Chem. **72**, 339 (1911).

Digitized by Google

stets dem Invertin. Und die letzten Invertinpräparate von H. v. Euler und O. Svanberg[1]) enthalten so viel Hefegummi, daß sie bei der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure 75—92 Prozent Monose liefern.

Entgegengesetzt war das Ergebnis der Untersuchungen von E. Salkowski[2]) über den Hefegummi und das Invertin der Hefe. Er fand, „daß es unter Umständen gelingt, stark wirksame Invertinlösungen zu erhalten, in denen sich auch nach starkem Eindampfen Gummi nicht nachweisen läßt". Dieser Satz wird im Kapitel C unserer Arbeit durch die Reinigung des Invertins mit Kaolin bestätigt.

Beim Ausziehen der Hefe mit Chloroformwasser von möglichst 0° konnte E. Salkowski gummiarme oder sogar gummifreie Lösungen darstellen, die Invertin enthielten. Freilich sind solche Invertinlösungen sehr schwach und sie enthalten nach unseren quantitativen Bestimmungen (Abschnitt IV, 2) höchstens ein paar Prozent vom Invertin der Hefe.

Die Methode von Salkowski, gummiarme Hefeauszüge darzustellen und auf Invertin zu verarbeiten, läßt sich, wie auch Salkowski selbst gefunden hat, schwer in einen präparativen Maßstab übertragen. Aber die quantitative Prüfung von Invertinlösungen, die unter Anwendung verschiedener Zellgifte erhalten wurden, bestätigt, daß große Differenzen im Hefegummigehalt vorkommen, und sie lehrt, daß es sich dabei nicht um einen einfachen Lösungsvorgang handelt. Wahrscheinlich wird der Hefegummi nach der Abtötung der Hefe durch einen gewissen enzymatischen Vorgang erst freigelegt, der andere Bedingungen erfordert als der enzymatische Eiweißabbau und der unter ähnlichen Bedingungen wie die Invertinauflösung günstig verläuft. Außerdem wäre es

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 175, 185 (1920); O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65, 86 (1920).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 124 (1909); s. auch K. Oshima, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 42 (1902), und dagegen B. Hafner, Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**, 1 (1904).

Digitized by Google

auch möglich, daß der Hefegummi unter bestimmten Bedingungen der Wasserstoffionenkonzentration durch enzymatische Hydrolyse aus dem Extrakt verschwände.

Die Auflösung des Gummis aus der Hefe ist bei der raschen Autolyse unter Anwendung von Chloroform gehemmt, dagegen verläuft sie gut bei der raschen Autolyse nach Hudson mit Toluol. Es dürfte sich hier so wenig wie bei dem Lösungsprozeß des Invertins um eine spezifische Wirkung des Chloroforms handeln, sondern eher darum, daß das Auftreten des Hefegummis in der Autolyse eine bestimmte Reaktion des Mediums und zwar in der Hefezelle zur Voraussetzung hat. Als wir nämlich die Invertindarstellung durch die rasche Autolyse bei Gegenwart von Chloroform wiederholten, aber unter Zusatz von Ammoniumphosphat, wurde der Gehalt an Hefegummi sehr groß. Und er war gleichfalls besonders groß bei der Invertingewinnung mit Toluol–Essigester–Ammoniumphosphat.

Zur Bestimmung des Hefegummis wandten wir die Methode der quantitativen Bestimmung mit Fehlingscher Lösung nach E. Salkowski[1]) an. Sie liefert uns keine genauen, aber der Größenordnung nach zuverlässige Werte, während wir die qualitative Prüfung mit Kupfersulfat, Ammoniak und Natronlauge nach E. Salkowski[2]) bei den Hefeextrakten nicht mit Sicherheit anzuwenden vermochten. In reineren Hefegummilösungen war diese Prüfung mit dem Reagens von Salkowski noch in Verdünnungen von 1:5000 zuverlässig, wenn das Ammoniak vorsichtig bemessen wurde. Man muß genug Ammoniak anwenden, um das Kupfer in Lösung zu bringen und zu halten, aber Überschuß von Ammoniak vermeiden, da darin die Hefegummi-Kupferverbindung auch bei Gegenwart von Natronlauge löslich ist.

Für die vergleichenden Bestimmungen des Hefegummis stellten wir in den Versuchen 1—4 der Tab. 18 aus der nämlichen Hefeprobe durch dreitägige Autolyse Extrakte dar; $2^1/_2$ kg frischer Hefe wurden mit gleichem

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 124, 127 (1909).

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. **27**, 497 (1894).

Digitized by Google

Gewicht Wasser und z. B. mit 62 g Diammoniumphosphat und je 250 ccm Essigester und Toluol angesetzt. Die Bedingungen für die Vergleichsversuche waren ähnlich; für die Autolyse bei Gegenwart von Chloroform dienten 50 ccm von diesem auf 300 g Hefe mit 300 ccm Wasser. Nur diese mit Chloroform dargestellten Hefeauszüge wirkten auf Fehlingsche Lösung unmittelbar beträchtlich reduzierend, enthielten also reduzierenden Zucker.

Die Gummibestimmungen wurden mit je 50 ccm der nicht gereinigten Filtrate durch Fällen mit 30 ccm Fehlingscher Lösung und weitere Behandlung des Niederschlages nach Salkowski ausgeführt, und die gefundenen Hefegummimengen (Tabelle 18) auf 1 kg trockene Hefe umgerechnet. Die mit Chloroform dargestellte Invertinlösung enthielt 40 mal weniger Hefegummi als die Lösung aus der Autolyse mit Essigester, Toluol und Ammoniumphosphat, während sich die Invertinmengen wie 1:3,3 verhielten. Der Gummigehalt der zuletzt angeführten Invertinlösung entsprach der von E. Salkowski bestimmten Gesamtmenge in der Hefe (6,9 Proz.).

Tabelle 18.

Gehalt verschiedener Invertinlösungen an Hefegummi.

Nr.	Darstellung der Invertinlösung	Zeitwert der Invertinlösung auf Hefe bez.	Gehalt an Hefegummi in 50 ccm	Hefegummi (g) in der Autolysenflüssigkeit aus 1 kg Trockenhefe
1.	Hefe mit Essigester-Toluol und Ammonphosphat	327	0,429	70
2.	Hefe mit Toluol . . .	380	0,247	40
3.	Hefe mit Essigester und Ammonphosphat . .	650	0,153	26
4.	Hefe mit Chloroform .	1090	0,011	1,8
5.	Hefe mit Chloroform und Diammonphosphat gab mit Fehlingscher Lösung einen starken Hefegumminiederschlag.			

Digitized by Google

IX. Darstellung von Invertinlösungen.

Aus den zahlreichen Varianten der raschen Autolyse ergeben sich für die praktische Anwendung folgende Verfahren:

1. Verfahren von Hudson (rasche Autolyse bei Anwendung von Toluol).

Die frische Preßhefe wird in das gleiche bis doppelte Gewicht Wasser eingetragen, mit 5—10 Proz. ihres Gewichtes an Toluol vermischt und nach kräftigem Durchschütteln, das man alle Tage wiederholt, bei Zimmertemperatur 4—7 Tage der Autolyse überlassen. Nach wenigen Stunden setzt unter beträchtlicher Gasentwicklung Selbstgärung ein, die bis zum folgenden Tage beendet ist. Nach einer Woche filtrieren wir die Hefeflüssigkeit auf einer Reihe von Faltenfiltern ab. Es ist nicht ratsam, ein Filter mehr als einmal nachzufüllen. Der abfiltrierte Auszug beträgt etwa 1400 ccm für 1 kg 20—22 prozentiger Frischhefe (oder bei Anwendung von 2 Teilen Wasser 2100 ccm), d. i. ungefähr 80 Proz. der entstandenen Hefeflüssigkeit, und sein Trockengewicht 85—123 g. Der darauf bezogene Zeitwert war 160—206 bei Anwendung unserer Brauereihefen vom Minutenwert 230—350.

Hudson befreite die Invertinlösung mit Bleiacetat von Eiweißkörpern und unterwarf sie nach der Beseitigung des überschüssigen Bleies mit Schwefelwasserstoff der Dialyse und zwar sofort, da sonst die aus dem überschüssigen Bleizucker stammende Essigsäure zerstörend wirkte. Es ist zweckmäßig, einen größeren Bleiüberschuß zu vermeiden, indem man Tüpfelproben in Schwefelammonium macht. Wenn die Flüssigkeit schon ein wenig Blei enthält, gibt sie zwar noch etwas mehr Fällung mit weiterem Bleiacetat, erfordert aber nur noch wenig davon. Der Eiweißniederschlag ist reichlich und gut filtrierbar. Das Filtrat gibt mit Schwefelwasserstoff nur ein wenig kolloides Bleisulfid,

Digitized by Google

das mit spanischer Klärerde koaguliert und abfiltriert wird. Die hellgelbe Invertinlösung ist schon ohne Dialyse haltbar.

2. Verfahren der raschen Autolyse mit Essigester + Toluol (oder Toluol allein) unter Neutralisieren mit Ammoniak oder Ammonphosphat.

Das Verfahren hat den Vorzug günstigerer Invertinausbeute und etwas größerer Reinheitsgrade. Die Frischhefe wird nach dem Eintragen in das gleiche (oder doppelte) Gewicht Wasser durch Versetzen mit Toluol und Essigsäureester (je 50 ccm auf 1 kg) verflüssigt. Man beginnt bald die auftretende Säure mit verdünntem Ammoniak zu neutralisieren nnd vervollständigt die Neutralisation in den ersten Stunden oft und weiterhin am ersten Tage noch einige Male. Die Auflösung des Invertins erfordert 3—4 Tage. Um die Invertinlösung filtrierbar zu machen, muß man sie mit Essigsäure neutralisieren, wodurch ein sehr starker Eiweißniederschlag entsteht, und läßt noch eine Stunde lang stehen. Dann lassen sich ungefähr 1500 ccm (aus 1 kg Hefe mit gleichem Gewicht Wasser) abfiltrieren mit meistens größerem Invertingehalt, als derjenige der Hefe war, und mit einem Trockengewicht von 57—85 g. Der Zeitwert einer solchen Invertinlösung, auf Trockenrückstand bezogen, betrug 114—142. Die weitere Reinigung zeigt keinen Unterschied gegenüber dem Hudsonschen Verfahren. Durch die Fällung mit Bleiacetat verminderte sich das Trockengewicht auf 47 (in mehreren Beispielen), während sich der Zeitwert auf 70—90 verbesserte.

Die Anwendung von Ammonphosphat ist bequemer und gleichmäßiger, die Autolysenflüssigkeit in diesem Falle schon ohne Behandlung mit Essigsäure besonders gut filtrierbar, der Reinheitsgrad und die Invertinausbeute pflegt noch etwas höher zu sein. Man verwendet für 1 kg Frischhefe 25 g $(NH_4)_2HPO_4$. Die filtrierte Invertinlösung wird entweder direkt mit Bleiacetat von Phosphorsäure und Proteinen befreit oder man fällt zuerst mit Magnesiumchlorid die Phosphorsäure aus und

Digitized by Google

enteiweißt das Filtrat mit Bleizucker, in diesem Falle mit einer viel geringeren Menge. Die Reinigungsoperationen bewirkten in einem solchen Beispiel keinen Verlust von Invertin, auch die Fällung von Magnesiumammonphosphat adsorbierte kein Enzym. Das Verhalten dieser Neutralextrakte war aber bei verschiedenen Darstellungen merkwürdig ungleich.

3. Invertinlösung aus Trockenhefe.

Da die frische Hefe von Lieferung zu Lieferung Unterschiede im Verhalten und im Invertingehalt aufweist, so wird die Verarbeitung gleichmäßiger und erfordert eine geringere Zahl von Analysen, wenn die Hefe getrocknet und die einzelnen Lieferungen vermischt werden.

Die Hefe wird an der Luft ausgebreitet und langsam getrocknet. Die gemahlene Trockenhefe wird mit der zehnfachen Menge Wasser und der ihr gleichen oder halben Menge Toluol vermischt und einige Zeit gerührt oder an der Maschine geschüttelt. Für die Reinheit des Invertins ist es besser, bei Zimmertemperatur die Auflösung in 2—3 Tagen vor sich gehen zu lassen, als das Verfahren durch Erwärmen abzukürzen. Auch bei der entwässerten Hefe bedeutet die Neutralisation eine Verbesserung und Abkürzung und, da der größte Teil der Säure rascher als bei frischer Hefe auftritt, so ist das Neutralextraktionsverfahren hier besonders bequem. Der Zeitwert einer solchen Invertinlösung, ungünstiger als bei der Autolyse von Frischhefe, war 260.

B. Uber die Adsorption des Invertins und Elution aus dem Adsorbat.

I. Theoretischer Teil.

Es war beabsichtigt, das Invertin durch abwechselnde Adsorption mit elektropositiven und elektronegativen Adsorbentien auf höhere Reinheitsgrade zu bringen. Die präparative Anwendung der Adsorptionsmethode ist

Digitized by Google

durch die Untersuchungen von L. Michaelis wesentlich gefördert worden. In der ersten Arbeit von L. Michaelis[1]) über „Die Adsorptionsaffinitäten des Hefeinvertins" wurde dieses als ein entschieden elektronegatives Kolloid gekennzeichnet. Es ließ sich nicht adsorbieren durch elektronegative Adsorbentien, Kaolin, Mastix, Arsensulfid, dagegen vollständig durch Eisen- und Aluminiumhydroxyd. Diese Angaben vervollständigten L. Michaelis und M. Ehrenreich[2]) in ihrer Abhandlung über „Die Adsorptionsanalyse der Fermente". Sie wählten solche Adsorbentien, „bei denen eine mechanische Adsorption nicht in Frage kommt", nämlich solche, die „unter allen Bedingungen entschiedene und einsinnige Ladungen tragen", wie Kaolin, Tonerde und Eisenhydroxyd. Dabei wurde festgestellt, daß alle Substanzen, die durch Kaolin adsorbiert werden können, Basen sein müssen, alle Substanzen, die durch Tonerde adsorbiert werden können, Säuren sein müssen. Daraus folgerten Michaelis und Ehrenreich: „Auf Grund dieses Leitsatzes sind wir aber in die Lage gesetzt, mit Leichtigkeit die elektrochemische Natur der von uns geprüften Fermente festzustellen. Invertin wird bei allen Reaktionen von Tonerde adsorbiert, bei keiner Reaktion von Kaolin, hat also den Charakter einer Säure."

Gegenüber diesen wegleitenden Betrachtungen ist zu berücksichtigen, daß die Enzyme nicht als reine Stoffe vorliegen. Man findet sie in den aus tierischen oder pflanzlichen Organen oder aus Pilzen gewonnenen Auszügen mit einem großen Vielfachen komplizierter organischer Verbindungen vergesellschaftet, nicht einfach im Zustand eines Gemisches, sondern durch Kräfte verbunden, wie sie auch in den Adsorptionsverbindungen mit unlöslichen Adsorbentien wirken. Auch wenn wir den relativen Gehalt der Hefeauszüge gegenüber denjenigen, mit welchen frühere Adsorptionsversuche ausgeführt wurden, der

[1]) Biochem. Zeitschr. 7, 488 (1907/08).

[2]) Biochem. Zeitschr. 10, 283 (1908).

Digitized by Google

Größenordnung nach steigern, so überwiegt dennoch nicht das Invertin, sondern die Masse der Begleitstoffe. Sie sind in ihrer Zusammensetzung durchaus nicht konstant, sondern wie im Kapitel A gezeigt wurde, kann man die Autolyse des Pilzprotoplasmas verschieden leiten, so daß die Natur der amphoteren Stoffe aus der Klasse der Proteine und der Proteinabbauprodukte ungemein schwankt. Davon ist das Verhalten gegen Adsorbentien und im Adsorbate abhängig.

Daher sagt die Adsorptionsanalyse oder die elektrische Überführung über die Natur eines Fermentes nichts aus, sondern sie läßt nur erkennen, ob in dem aus einem Ferment und seinen jeweiligen Begleitstoffen gebildeten Additions- oder Adsorptionsprodukt die Säure- oder Basennatur überwiegt. Dabei hängt es von schwer bestimmbaren Versuchsbedingungen ab, daß das Enzym in die eine oder andere Assoziation mit Begleitstoffen, in eine elektropositive oder eine elektronegative gelangt.

Ein Beispiel aus dem nachstehenden Kapitel für diese Betrachtung ist das Verhalten des Invertins gegen Kaolin. Wenn das Enzym durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution aus dem Adsorbat von einem bedeutenden Teil des Ballastes befreit worden ist, so wird es aus der wäßrigen Lösung quantitativ durch Kaolin adsorbiert. Daraus ergibt sich, daß Invertin nicht elektronegativ, sondern amphoter ist, aber auch diese Folgerung gilt zwar für reinere, indessen gewiß noch unreine Präparate.

Noch mehr wie das Adsorptionsverhalten wird die Beständigkeit der Adsorbate durch die Begleiter bestimmt. Dieser Einfluß macht sich bei dem für die präparative Anwendung wichtigen Versuche geltend, die Adsorptionsverbindung eines Enzyms zu lösen. Dafür fehlte es bisher an Angaben und Methoden.

Für das Invertin sind in dieser Hinsicht nur zwei Versuche von H. v. Euler und S. Kullberg[1]) und H. v. Euler

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 385 (1911).

Digitized by Google

und O. Svanberg[1]) veröffentlicht worden. Im ersten Falle diente kolloide Eisenlösung zur Adsorption. Die Fällung behandelten Euler und Kullberg mit 0,05-prozentiger Salzsäure und sie fanden in der entstandenen sauren Lösung die Wirksamkeit des Invertins gesteigert, aber die Ausbeute gering. Ebenfalls durch Auflösen in 0,1 n-Salzsäure untersuchten Euler und Svanberg das in ihrem neueren Versuche dargestellte Adsorbat von Invertin mit in der Kälte gefälltem Aluminiumhydroxyd. Dieses Adsorbens zeigte nach Euler und Svanberg „kein selektives Adsorptionsvermögen, weder gegen die Saccharase, noch gegen die inaktiven Begleitsubstanzen derselben".

Die Methode der Enzymadsorption und Zerlegung des Adsorbates ist am Beispiel der Peroxydase[2]) weiterentwickelt worden, das uns für die Versuche mit Invertin als Vorbild diente. Für die Bindung und Entbindung des Enzyms bedeutete es eine Verbesserung[3]), zwei verschiedene Lösungsmittel anzuwenden, um „die Verteilung der Peroxydase zwischen Lösungsmittel und Adsorbens zugunsten des letzteren bei der Adsorption, im entgegengesetzten Sinne bei der Umkehrung des Vorganges, der Elution, zu beeinflussen". Auch die Adsorption des Invertins wird vervollkommnet, indem man statt wäßriger Lösungen wäßrig-acetonige anwendet. Mit dreimal weniger Absorbens entstehen Adsorbate, in denen das Verhältnis von Invertin zum Trockenrückstand dreimal günstiger ist als bei der Adsorption aus wäßriger Lösung.

Ein weiterer Fortschritt bestand in der fraktionierten Adsorption der Peroxydase, die auf zwei Wegen gelang. Es war nicht nur möglich, das Enzym auf höhere Konzentration zu bringen, indem man es unter Hinterlassung von Begleitstoffen durch Aluminiumhydroxyd adsorbierte, das Verfahren ließ sich gleichfalls mit Tonerde auch so

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269, 290 (1919).
[2]) R. Willstätter, diese Annalen **422**, 47 (1921).
[3]) a. a. O., S. 61.

Digitized by Google

leiten, daß überwiegend die begleitenden Stoffe adsorbiert und aus der Restlösung das nicht adsorbierte Enzym in hohem Reinheitsgrad wiedergewonnen wurde.

Die Zerlegung des Peroxydaseadsorbates ist mit sehr schwacher Säure glatt erzielt worden, am besten mit kohlensäurehaltigem Wasser. Auch die Invertinadsorbate und zwar ebensogut in elektronegativen, wie elektropositiven Adsorbentien, vermögen wir in vielen Fällen mit einfachen chemischen Mitteln zu zerlegen, und zwar mit sehr verdünnten Alkalien, namentlich Ammoniak (von 0,01—0,1 Proz.) oder mit sekundären Alkaliphosphaten. Ammoniak bewirkt in besonders geeigneten Fällen die Elution, sekundäres Phosphat in allen untersuchten. Die Elution beruht auf der Überwindung der kleinen Affinitätsbeträge, die in den Adsorbaten wirken, durch etwas stärkere Affinitäten. Die Rolle der Eluentien wird erst dann genauer zu erklären sein, wenn man das Verhalten des Enzyms in verschiedenen, namentlich in noch höheren Reinheitsgraden kennt.

Das bemerkenswerteste unter den verschiedenen Eluentien ist Rohrzucker, mit dem wir das Invertin leicht und quantitativ aus dem Aluminiumhydroxyd freilegen können, während er das Invertin aus der Hefezelle nicht zu eluieren vermag.

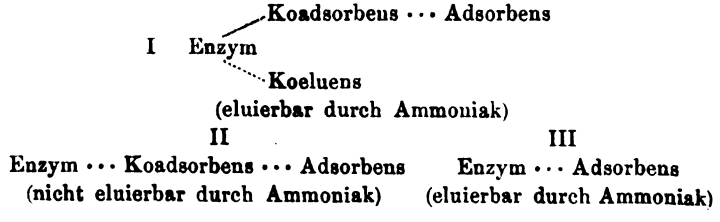
Die Elutionserscheinungen gewähren tieferen Einblick in die Zusammensetzung der Enzymadsorbate. Die Zusammensetzung und demzufolge das Verhalten der Adsorbate ist nämlich von den Bedingungen ihrer Bildung abhängig. Wenn das Invertin aus dem wäßrigen Hefeauszug bei Gegenwart von Ammoniak adsorbiert wird, was quantitativ gelingt, so verhält sich das Adsorbat anders als nach der Darstellung aus ammoniakfreier, am besten acetonhaltiger Lösung. Das Invertin ist im ersteren Falle aus dem Adsorbat gar nicht durch Ammoniak eluierbar. Dem Adsorbat fehlen entweder Stoffe, die beim Eluieren mitwirken, oder es enthält zusammen mit dem Invertin Stoffe, die es fester an das

Digitized by Google

Aluminiumhydroxyd binden. Es zeigt sich, daß Stoffe *beider* Art in den Adsorbaten vorkommen. Manche Tonerdeadsorbate enthalten Begleitstoffe, deren Beseitigung das Eluieren des Invertins verhindert; andere enthalten Begleitstoffe, durch deren Beseitigung die Elution des Invertins erst ermöglicht wird. Ein Verfahren, solche Begleitstoffe aus den Hefeauszügen zu entfernen, ist ihre Vorbehandlung mit Bleiacetat. Nach dieser Reinigung fehlt der durch rasche Autolyse gewonnenen Invertinlösung ein Stoff, der das Eluieren aus dem Adsorbat durch Ammoniak ermöglicht. Hingegen liefern nur nach dieser Reinigung die durch Neutralextraktion gewonnenen Hefeauszüge Adsorbate, die mit Ammoniak eluierbar sind.

Diese Begleitstoffe, deren Einfluß im folgenden genauer beschrieben wird, sollen als „*Koadsorbentien*“ und „*Koeluentien*“ unterschieden werden. Es ist wahrscheinlich, daß das Adsorbendum an das Adsorbens sowohl unmittelbar gebunden, wie auch durch die Vermittlung eines Koadsorbens gebunden auftritt und daß es ferner mit solchen Begleitstoffen assoziiert sein kann, an denen das Ammoniak beim Eluieren angreift, und daß diese auch fehlen können. Fehlen die Koadsorbentien, so ist das Enzym lockerer gebunden und das Eluieren kann auch ohne Koeluentien erfolgen. Auch die Koadsorbentien differieren in Zusammensetzung und Verhalten. Denn in den Produkten der raschen Autolyse sind sie nicht durch Bleiacetat fällbar, hingegen sind sie fällbar in den bei neutraler Reaktion gebildeten Hefeauszügen.

Mit den folgenden Formeln der Adsorbate suchen wir für diese Beobachtungen einen einfachen Ausdruck aufzustellen:



Digitized by Google

II. Verhalten des Invertins in den Hefeauszügen gegen Kaolin.

Nachdem L. Michaelis[1]) beoachtet hatte, daß Invertin von Kaolin nicht adsorbiert werde, fanden H. v. Euler und S. Kullberg[2]) zur Darstellung wirksamer Invertinpräparate „eine Kombination der Enteiweißung mit Bleiacetat und mit Kaolin" geeignet.

Unsere Versuche ergaben, daß auch in den durch rasche Autolyse nach Hudson entstehenden Invertinlösungen das Enzym selbst von viel Kaolin nicht adsorbiert wird. Diese Bestätigung war nicht nur wegen der nützlichen Anwendung von Kaolin allein für eine erste Reinigung der Invertinlösung von Interesse, sie war auch für den Vergleich des Verhaltens von unreinem und reinem Invertin von Wichtigkeit.

Diese erste Behandlung mit Kaolin ist daher ohne Verlust von Invertin möglich. Aber sie ist ungenügend. Denn wenn mit dieser Eiweißbeseitigung (Behandlung mit 10 Proz. Kaolin über Nacht) und dann weiter durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution und Adsorption mit Kaolin und Elution Invertin gereinigt wurde, so schleppte das Enzym sogar bei einem Zeitwert von 0,86 noch immer viel Eiweiß mit. Es zeigte in 0,3-prozentiger Lösung noch deutliche Biuretreaktion, kräftige Millonsche Reaktion und gab eine Fällung mit Ferrocyankalium und Essigsäure. Dagegen verschwand dieser hartnäckige Begleiter, wenn die Eiweißadsorption durch Kaolin in wäßrig-acetoniger Lösung vorgenommen wurde. Die Anwendung eines schlechteren Lösungsmittels für die Eiweißkörper befördert eben ihre Adsorption durch das Kaolin, das der Invertinlösung ein Vielfaches von Begleitstoffen entzieht, wenn sie mit Aceton mäßig verdünnt ist.

Ein nach Hudson dargestellter Hefeauszug wurde a) mit 12 Proz. seines Gewichtes an Kaolin geschüttelt;

[1]) Biochem. Zeitschr. 7, 488 (1907/08).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 335 und zwar 338 (1911).

Digitized by Google

das Kaolin nahm 0,7 Proz. vom Trockengewicht der Invertinlösung auf. In b) und c) wurde dieser Extrakt mit 40 Proz. seines Volumens an Aceton vermischt und mit 12 Proz. Kaolin geschüttelt. Das Kaolin entzog nun der Invertinlösung b) 8,2 und c) 6,2 Proz. ihres Trockenrückstandes.

Daher mußte auch die Vorfrage entschieden werden, ob auch unter diesen Umständen Kaolin kein Invertin mit entfernt. Es zeigte sich, daß gewöhnlich in acetonhaltiger Lösung Kaolin einen kleinen Teil des Invertins adsorbiert, mitunter gar nichts, aus manchen Hefeauszügen aber ziemlich viel.

Den ersten Versuch mit Invertin in wäßriger Lösung führten wir mit Autolysenflüssigkeit aus, ehe sie von den Heferückständen abfiltriert war. Nach Behandeln mit 10 Proz. ihres Gewichtes an Kaolin saugten wir durch ein Pukallsches Tonfilter ab (Anh. Nr. 96 A).

Nulldrehungszeit der Hefeflüssigkeit 39,8,
„ nach Filtrieren von Kaolin . 40,6.

Für den zweiten Versuch diente eine andere, von der Hefe abfiltrierte Invertinlösung, die wir mit 12 Proz. Kaolin behandelten (Anh. 96 B).

Nulldrehungszeit der Invertinlösung 53,
„ nach Behandeln mit Kaolin . 53.

Im dritten Versuch wurde ein Hefeauszug sogar mit dem gleichen Gewicht Kaolin bearbeitet (300 ccm mit 300 g); da der Zeitwert sich dabei etwas verbesserte, scheint das Kaolin der Lösung Wasser entzogen zu haben (Anh. 97).

Nulldrehungszeit der Lösung 87,5,
„ nach Behandeln mit Kaolin . 80.

Hinsichtlich der Einwirkung von Kaolin auf die wäßrig-acetonige Lösung des Invertins liegt in vielen Versuchen, in denen diese Behandlung der Adsorption mit Tonerde vorangeht, die Erfahrung vor, daß kein oder fast kein Verlust eintrat. In einem besonderen

Digitized by Google

Versuch wurden 100 ccm Hefeauszug mit 40 ccm Aceton und 12 g Kaolin behandelt und nach dem Abfiltrieren durch Eindampfen im Vakuum vom Aceton befreit. Der Menge–Zeit–Quotient vor dem Versuche war 0,50, am Ende 0,50. Für das davon abweichende Verhalten liegen Bestimmungen vor, die direkt mit dem acetonhaltigen Filtrat vom Kaolin ausgeführt sind, und zwar mit 10 ccm, die man mit der Zuckerlösung auf 100 ccm brachte. Das Aceton bewirkte bei einem so niedrigen Prozentgehalt in der Bestimmungsflüssigkeit keine beträchtliche Hemmung der Invertinwirkung. In allen Fällen ließen wir das Kaolin, und zwar 10 Proz. vom Gewicht des acetonfreien Extraktes, über Nacht auf die mit 40 Proz. ihres Volumens Aceton verdünnte Invertinlösung einwirken.

1. Versuch. Drei Proben des nämlichen Hefeauszuges ergaben Rückgang des M.Z.Q. von 6,20 auf 5,45, 5,10, 5,23, also Invertinverluste von 12, 18, 15,5 Proz. Die Werte sind Maximalwerte, sie können bis zu 6 Proz. zu hoch sein (Anh. Nr. 98).

2. Versuch. Zwei Proben eines anderen Extraktes ergaben Abnahme der M.Z.Q. von 8,70 auf 6,50 und 7,47, also Invertinverluste von 25,5 und 14 Proz. (Anh. Nr. 99).

3. und 4. Versuch. Bei zwei weiteren Extrakten gingen die M.Z.Q. von 0,499 auf 0,455 und von 0,525 auf 0,462 zurück; also Invertinverluste von 7 und 12 Proz. (Anh. Nr. 100 und 101).

5. Versuch. Ein anderer Hefeauszug erlitt unter denselben Bedingungen Rückgang des M.Z.Q. von 4,85 auf 3,06, also Invertinverlust von 37 Proz. (Anh. Nr. 102).

Das Verhalten der Autolysenflüssigkeiten ist nicht konstant. In einer derselben (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser; Februar 1920) war das Invertin durch Kaolin so reichlich adsorbierbar, daß dieses aus der 28 Proz. Aceton enthaltenden Flüssigkeit, nach 20 Stunden abgetrennt, 33,2 Proz. des Invertins enthielt; davon gehen etwa

Digitized by Google

4 Proz. für den Invertingehalt der im Kaolin enthaltenen Waschflüssigkeit ab. M.Z.Q. des angewandten Extraktes war nämlich 0,65, der des Kaolins 0,22 (Anh. Nr. 103).

III. Adsorption des Invertins durch Aluminiumhydroxyd.

1. Beständigkeit des Invertins in Acetonlösung.

Die Anwendung acetonig-wäßriger Lösung ist nach der Reinigung des Invertins mit Kaolin auch für die Adsorption mit Aluminiumhydroxyd vorteilhaft. Die aufeinander folgende Behandlung mit Kaolin und Aluminiumhydroxyd erforderte bei großen Mengen soviel Zeit, daß eine Schädigung durch das organische Solvens zu befürchten war. Das Aceton übt ähnlich wie Alkohol auf das Invertin außer der Hemmung auch zerstörende Wirkung aus, die in Kapitel C genauer beschrieben wird. Diese Schädigung des Enzyms ist von seinem Reinheitsgrad ungemein abhängig. Glücklicherweise ist das Invertin durch seine Begleitstoffe in den Hefeauszügen genügend geschützt, so daß es in 28 Proz. Aceton enthaltender Lösung dieses geringen Reinheitsgrades während mehrer Tage nicht erheblich leidet.

Tabelle 19.

Beständigkeit des Invertins in 28 Proz. Aceton enthaltenden Hefeauszügen.

	Hefeauszug					
	I (Anh. 104)	II (Anh. 105)	III (Anh. 106)	IV (Anh. 107)	V (Anh. 108)	VI (Anh. 10[illegible])
Nulldrehungszeit bei Versuchsbeginn . . .	278	654	285	476	280	100
Nulldrehungszeit nach 2 Tagen	278	—	301	415	236	92
Nulldrehungszeit nach 3 Tagen	262	690	310	384	261	—
Nulldrehungszeit nach 7 Tagen	298	660	340	492	258	—

Digitized by Google

Viel empfindlicher ist das Invertin schon in dem Reinheitsgrad, den es durch einmalige Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution mit Ammoniak erreicht. Für die so erhaltenen Invertinlösungen war ein organisches Fällungsmittel nötig. Aber hier läßt sich die Einwirkungszeit auf einige Minuten abkürzen, da das Invertin aus der eingeengten wäßrigen Flüssigkeit nur bei 0° mit Aceton gefällt und in der Zentrifuge rasch abgetrennt zu werden braucht.

Überraschend war die völlige Zerstörung des Invertins durch Aceton bei Gegenwart von Ammoniak oder Ammoniumsalzen. Ein unter Neutralisation mit Ammoniak dargestellter, mit Essigsäure schwach angesäuerter Hefeauszug änderte seine Wirksamkeit zwei Monate gar nicht, verlor aber nach Versetzen mit 40 Proz. Aceton in drei Tagen 88 Proz. der Invertinwirkung (Anhang Nr. 110). In einer zweiten Probe der Invertinlösung betrug der Rückgang nach Zufügen des Acetons sogar in einer Stunde 43, in 24 Stunden 93 Proz. (Anhang Nr. 111.) Natürlich verhalten sich ebenso anders dargestellte Aceton enthaltende Hefeauszüge, sobald sie mit etwas Ammonacetat versetzt wurden; wir beobachteten z. B. in 24 Stunden Abnahme um 83 Proz. (Anhang Nr. 112). Dagegen war Ammoniumphosphat (die in einem mit diesem Puffer dargestellten Auszug enthaltene Menge) zusammen mit Aceton 24 Stunden lang unschädlich (Anhang Nr. 113) Besonders energisch ist die Wirkung des Ammoniaks bei Gegenwart von Magnesiumsalzen. Wir versetzten die Hefeauszüge mit Magnesiumacetat oder Magnesiumchlorid und Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion; die Invertinwirkung blieb konstant. Als aber 40 Proz. des Volumens an Aceton zugefügt wurde, trat in wenigen Stunden quantitative Zerstörung des Invertins ein.

Die Erklärung für diese Erscheinung liegt in der Bildung von Diacetonamin bei der Einwirkung des Ammoniaks auf Aceton, besonders, wie es sich zeigt, bei Gegenwart von Magnesiumsalz. Das Amin übt auf

Digitized by Google

das Enzym eine Giftwirkung aus, die als eine einfache chemische Reaktion des Invertins mit der Aminogruppe der Base zu verstehen ist, ähnlich wie die von H. v. Euler und O. Svanberg[1]) vor kurzem beschriebenen Giftwirkungen z. B. von Anilin und Anilinderivaten.

2. *Selektive Adsorption.*

Es ist eine Erfahrung aus dieser Arbeit, daß eine bestimmte Sorte Aluminiumhydroxyd unter verschiedenen Bedingungen, z. B. in wäßriger oder acetonig-wäßriger Lösung ungefähr gleiche Stoffmengen, aber verschiedene Mengen Enzym adsorbiert. Daher wird das Invertin, je weniger Aluminiumhydroxyd man braucht, um eine gegebene Menge desselben zu adsorbieren, in desto reinerem Zustande dadurch erhalten. Die zur Adsorption des Invertins erforderliche Menge von Aluminiumhydroxyd ist ein gewisses Maß seiner Selektivität. Wenn z. B. für eine mit 40 Volumprozent Aceton vermischte Invertinlösung dreimal weniger Aluminiumhydroxyd zur quantitativen Adsorption des Enzyms nötig war, wie in der wäßrigen Lösung, so war auch das adsorbierte Trockengewicht für die gegebene Invertinmenge im ersten Falle ungefähr dreimal geringer.

Das Adsorptionsvermögen nicht nur verschiedener Adsorbentien, auch verschiedener Darstellungen von Aluminiumhydroxyd differiert in weiten Grenzen und das Adsorptionsvermögen eines bestimmten Adsorbenspräparates differiert je nach den Bedingungen seiner Anwendung. Das Adsorptionsvermögen der Tonerde oder eines anderen Adsorptionsmittels für Invertin drücken wir mit einem Maße aus, das „Adsorptionswert" für bestimmte Bedingungen der Adsorption heißen soll; es läßt sich natürlich mutatis mutandis auf die Adsorption anderer Enzyme übertragen. Als „Adsorptionswert" bezeichnen wir die Menge Rohrzucker in Gramm, die in 16 prozentiger Lösung, enthaltend 1 Proz. NaH_2PO_4, von 1 g

[1]) Fermentforschung 4, 29 (1920).

Digitized by Google

unter bestimmten Bedingungen mit Invertin gesättigtem Adsorbens bei 15,5° in 1 Minute zur 0-Drehung invertiert wird.

Beispiele. Von der mit Invertin gesättigten Aluminiumhydroxydsuspension ließen wir 2,5 ccm, enthaltend 0,0638 g $Al(OH)_3$, auf 4 g Rohrzucker unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition einwirken. Da gemäß der gefundenen Nulldrehung von 35 Minuten für 1 g Aluminiumhydroxyd 35·0,0638 Minuten nötig wären, um 4 g Rohrzucker zu 75,75 Proz. zu spalten, so würden in 1 Minute $\frac{4}{35 \cdot 0{,}0638} = 1{,}787$ g Zucker auf 0° invertiert.

Indirekt ergab sich der Adsorptionswert aus der Wirkungsabnahme einer Invertinlösung und der Adsorbensmenge. Von einem acetonhaltigen Hefeauszug ergaben 2,5 ccm die Nulldrehungszeit 103. Von dieser Invertinlösung erforderte 1 Liter 3,97 g Aluminiumhydroxyd, um 88 Proz. des Enzyms zu entfernen. Dann wären für 2,5 ccm anzuwenden $\frac{3{,}97 \cdot 2{,}5}{1000}$ g, denen die Nulldrehungszeit $\frac{103 \cdot 88}{100}$ zukam. Für 1 g $Al(OH)_3$ berechnet sich daher die Nulldrehungszeit $\frac{3{,}97 \cdot 2{,}5 \cdot 103 \cdot 88}{1000 \cdot 100}$. Der Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds, die von 1 g, invertingesättigt, in 1 Minute invertierte Zuckermenge, ist also $\frac{4 \cdot 1000 \cdot 100}{3{,}97 \cdot 2{,}5 \cdot 103 \cdot 88} = 4{,}46$ g.

Den Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds, das wir durch Fällung mit Ammoniak aus dem Sulfat dargestellt hatten, bestimmten wir mit einem Hefeauszug unter verschiedenen Bedingungen und fanden ihn in acetonhaltiger Lösung größer als in alkoholhaltiger und 3—8 mal größer als im schwach sauren oder schwach ammoniakalischen Hefeauszug ohne organisches Solvens.

	Adsorptionswert
1. Für den sauer reagierenden Hefeauszug	0,45
2. „ „ schwach ammoniakalischen Hefeauszug . .	0,39
3. „ „ 28 Proz. Alkohol enthaltenden Hefeauszug .	1,49
4. „ „ 28 Proz. Aceton enthaltenden Hefeauszug .	1,93

Digitized by Google

Tabelle 20.

Selektive Adsorption mit Aluminiumhydroxyd.

Bezeichnung des Hefeauszuges	a) Mit Gehalt von 28 Proz. Aceton				b) Ohne Gehalt an Aceton			
	Zur Adsorpt. erforderl. $Al(OH)_3$	Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds	Adsorb. Trockengew. in Proz. vom Extraktrückstand	Zeitwert der im Al.-Hydr. enthaltenen Substanz	Zur Adsorpt. erforderl. $Al(OH)_3$	Adsorptionswert des Aluminiumhydroxyds	Adsorb. Trockengew. in Proz. vom Extraktrückstand	Zeitwert der im Al.-Hydr. enthaltenen Substanz
1. Hefeauszug, mit Kaolin gereinigt, 50 ccm bei a) 36 ccm bei b)	0,415	1,72	4,4	6,8	1,46	0,685	14,4	23,5
2. Derselbe Auszug 50 ccm	0,415	1,20	4,5	10	1,46	0,342	12,3	28,8
3. Anderer, ebenso gerein. Hefeauszug 500 ccm .	1,89	1,99	3,9	9,3	—	—	—	—
4. Derselbe, fast doppelt so konzentriert, 260 ccm .	1,89	1,96	5,9	11,6	—	—	—	—
5. Anderer, ebenso gerein. Auszug 1570 ccm . .	10,0	3,2	10,3	19,8	—	—	—	—
6. Mit Bleiacetat gerein. Auszug, 300 ccm bei a) 50 ccm bei b)	1,74	4,2	8	7	0,87	1,39	31	28
7. Anderer, ebenso gerein. Auszug, 750 ccm bei a) 100 ccm bei b)	6,58	3,06	14,6	12	3,29	0,82	32	27,5

Digitized by Google

Genauer und vollständiger ist eine Versuchsreihe, in der Hefeauszüge nach Vorreinigung bis zur vollständigen Wegnahme des Invertins mit Aluminiumhydroxyd behandelt wurden. Aus der Menge des letzteren und den Zeitwerten der Extrakte ergaben sich die Adsorptionswerte von 0,34—4,2 und aus den Trockengewichten der Lösung vor und nach der Adsorption gingen die Invertinzeitwerte 6,8—28,8 für die im Aluminiumhydroxyd enthaltenen Substanzmengen hervor (Invertingehalt bezogen auf 0,05 g Trockengewicht). Man erkennt ferner aus der Tabelle 20, daß für die Adsorption aus einem Hefeauszug mit Acetonzusatz der Zeitwert soviel günstiger ist, als das entfernte Trockengewicht kleiner im Vergleich zur Adsorption aus wäßrigem Medium.

Die Adsorption wurde gewöhnlich bei schwach saurer Reaktion der Invertinlösung vorgenommen; sie gelingt mit etwas mehr Adsorbens auch mit schwach ammoniakalischem Medium, aber in diesem Falle wird schon an das Waschwasser viel Invertin wieder abgegeben.

Das angewandte Aluminiumhydroxyd war aus reinem Aluminiumsulfat oder Ammonalaun dargestellt.[1]) Die siedende Lösung des Aluminiumsalzes wurde in dünnem Strahl in 15prozentiges Ammoniak eingetragen, das im Emailtopf durch Einleiten von Dampf erhitzt und weiter mindestens 1 Tag im Kochen erhalten wurde. Wenn nach dem Auswaschen durch Dekantieren, was 1 Woche zu dauern pflegt, mit Nesslers Reagens keine Färbung mehr entsteht, so bildet das Aluminiumhydroxyd eine zähe, plastische Masse, und verteilt sich zum Teil kolloidal. Das Adsorbens ist dann gut brauchbar, selbst wenn es noch Spuren von SO_4-Ion enthält. Um auch diese noch zu entfernen, muß man ein zweites Mal mit

[1]) Vgl. R. Willstätter, diese Annalen 422, 47 und zwar 72 (1920/21).

Digitized by Google

Ammoniak erhitzen und dies, da man nicht mehr dekantieren kann, so lange fortsetzen, bis die Flüssigkeit ammoniakfrei ist.

Wir verglichen die Adsorptionswirkung dieses Aluminiumhydroxyds, das sich in Mineralsäure auch in der Hitze nur langsam löst, mit einem in Säure leicht löslichen, schönen Präparat von E. Merck, dem „Aluminiumhydroxyd in Teigform“ und mit dem trockenen Aluminiumhydroxyd puriss. subt. derselben Fabrik. Das unter langem Kochen dargestellte Hydroxyd, das wahrscheinlich eine wasserärmere, höher molekulare Verbindung ist, besitzt $2^1/_2$—3 fach höheren Adsorptionswert als das „Aluminiumhydroxyd in Teigform“ und 8—9 fachen im Vergleich zum feinen Pulver des Handels.

Auch der Reinheitsgrad des Invertins, das mit einem käuflichen Aluminiumhydroxyd adsorbiert und daraus wie sonst mit Ammoniak eluiert wurde, blieb zurück hinter dem analoger Präparate, die mit Hilfe des beschriebenen Aluminiumhydroxyds gewonnen waren.

3. Bestimmung des Invertins im Adsorbat.

Für die Peroxydase wurde vor kurzem gezeigt[1]), daß man die Wirksamkeit des Enzyms nach seiner Adsorption, z. B. durch Aluminiumhydroxyd, wie bei dem in Wasser gelösten quantitativ bestimmen kann und daß die Purpurogallinzahl bei der Adsorption unverändert bleibt. Das Entsprechende trifft auch beim Invertin zu. Eine Invertinlösung ändert ihren Zeitwert nicht, wenn sie mit Aluminiumhydroxyd vermischt und durchgeschüttelt wird. Auch fanden wir in einer Reihe von Adsorptionsversuchen (Tabelle 21) mit Aluminiumhydroxyd im Adsorbat meistens 100 Proz. vom Invertin des angewandten Hefeauszuges.

[1]) R. Willstätter, diese Annalen 422, 47 und zwar 61 (1920/21).

Digitized by Google

Tabelle 21.

	I. Hefeauszug nach Hudson (Anh. Nr. 114)	II. Hefeauszug nach Hudson (Anh. Nr. 115)	III. Hefeauszug, nach Neutralverf. mit Bleiacetat gerein. (Anh. Nr. 116)
M.Z.Q. des Hefeauszuges . . .	0,714	0,321	0,465
M.Z.Q. des Adsorbates	—	0,323 = 100 %	0,470 = 100 %
M.Z.Q. des Adsorbates aus wäßrig-acetonig. Lösung	0,714 = 100 %	0,323 = 100 %	0,335 = 52 %

Daß das Invertin im Zustand der Adsorptionsverbindung noch wirksam ist, hat L. Michaelis[1]) als erster nachgewiesen. Er schloß daraus: „Das Ferment braucht also nicht in Lösung zu sein, um seine Wirkung zu entfalten, sondern hat auch in adsorbiertem Zustande seine Wirksamkeit. Das legt die Möglichkeit besonders nahe, daß das Ferment auch in seiner scheinbaren wäßrigen Lösung nicht in wirklich gelöstem Zustande, sondern als mikroheterogene Phase im Sinne Bredigs enthalten sein kann."

Es war wohl möglich, daß das Invertin im Adsorbat wirkt ohne gelöst zu sein, denn es wirkt auch vollkommen in der Hefezelle und scheint in ihr in einem unlöslichen Zustande enthalten zu sein. Aber es verhält sich anders im Adsorbat. Während es aus der Hefezelle vom Rohrzucker nicht herausgelöst wird, eluiert der Zucker der Bestimmungslösung das Enzym quantitativ aus dem Adsorbat. Das Invertin wirkt also gelöst bei der Prüfung des Adsorbates.

Zu der bei der Zeitwertbestimmung üblichen Rohrzuckerlösung wurden 10 ccm in Wasser suspendiertes Adsorbat gegeben, das in der Zentrifuge vom Extrakt abgetrennt und gewaschen worden war. Nach 39 Minuten

[1]) Biochem. Zeitschr. 7, 488 (1907/08).

Digitized by Google

wurde eine Probe von der Bestimmungslösung entnommen und mit Soda sistiert. Zugleich wurde rasch der Rest der Bestimmungslösung in der Zentrifuge vom Aluminiumhydroxyd getrennt und in der klaren Flüssigkeit erst nach weiteren 51 Minuten mit Soda die Inversion unterbrochen. Die Drehung der Lösung hatte nach den 39 Minuten 9,60° betragen und in den folgenden 51 Minuten auf 2,47° abgenommen. Aus diesen beiden Proben berechnet sich aber dieselbe Nulldrehungszeit, nämlich 116 und 117 Minuten; das Enzym war mindestens am Ende des ersten Zeitabschnittes quantitativ frei in Lösung.

4. Beständigkeit des Invertins im Adsorbat.

Die Hefeauszüge zeigen in langen Zeiträumen konstante Invertinwirkung. Diese Beständigkeit des Invertins beruht auf der Schutzwirkung von Begleitstoffen. In den Adsorbaten ist das Enzym meistens weniger beständig und es ist ungleichmäßig beständig. Die Erscheinung bietet große Mannigfaltigkeit, die wesentlich darauf zurückzuführen sein dürfte, daß in den Hefeauszügen Stoffe enthalten sein können oder fehlen können, die auf das Enzym störend einwirken und ferner, daß dem Invertin in die Adsorbate hinein genügende oder ungenügende Mengen von schützend wirkenden Begleitstoffen folgen.

Für die Mehrzahl der Versuche dienten die durch rasche Autolyse bei Gegenwart von Toluol bereiteten Invertinlösungen, verdünnt mit 40 Prozent Aceton. Das Enzym wurde quantitativ vom Aluminiumhydroxyd aufgenommen, das Adsorbat quantitativ in der Zentrifuge abgetrennt, und in derselben zwei- bis dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Solche Adsorbate zeigen mitunter z. B. in Versuch 1 bei mehrtägigem Stehen langsames Verderben des Invertins.

Versuch 1 (Anhang Nr. 117).

Adsorbat 6 Stunden alt M.Z.Q. = 1,45.
Dasselbe 6 Tage alt M.Z.Q. = 1,265; Invertingehalt = 87,5 Proz.
Dasselbe 18 „ „ M.Z.Q. = 0,825; „ = 57 „

Digitized by Google

Die Adsorbate waren öfters weniger haltbar in den Hefeauszügen selbst, in denen sie gebildet waren. Im Versuch 2 wurde vom Adsorbat eine Probe bald nach dem Zufügen des Adsorbens bestimmt und weitere Proben nach längerem Stehen in der vom Enzym befreiten acetonhaltigen Autolysenflüssigkeit.

Versuch 2 (Anhang Nr. 118).

	M.Z.Q.	Invertingehalt
Adsorbat, sofort nach Bildung . . .	1,04	—
Dasselbe, 4 Stunden lang im Hefeauszug	0,75	74 Proz.
Dasselbe, 4 Tage „ „ „	0,637	63 „

Die Autolysenflüssigkeit kann z. B. etwas Amin enthalten, von Carboxylase aus Aminosäure gebildet, und dieses vermag, ähnlich wie nach Euler und Svanberg Anilin, mit dem Invertin unter Zerstörung seiner enzymatischen Wirkung zu reagieren.

Den Vergleich der Beständigkeit im Hefeextrakt und nach der Abtrennung von ihm wiederholten wir mit Aluminiumhydroxydadsorbat aus dem nämlichen Hefeauszug, und zwar im Parallelversuch mit und ohne den Gehalt von 28 Proz. Aceton. Der dritte Versuch (Tabelle 22) zeigt, daß das Invertin beim Aufbewahren des Adsorbates in der Mutterlauge mehr leiden kann als im isolierten Adsorbat, daß aber die Gegenwart von Aceton ohne Einfluß ist.

Tabelle 22 (Versuch 3, Anhang Nr. 115).

	Versuch mit Hefeauszug ohne Aceton		Versuch mit Hefeauszug + 40 Proz. Aceton	
	M.Z.Q. des Adsorbats	Invertingehalt in Proz.	M.Z.Q. des Adsorbats	Invertingehalt in Proz.
Adsorbat, sofort nach Eintragung des $Al(OH)_3$.	0,323	100	0,323	100
Adsorbat, 20 Stunden im Hefeauszug	0,255	79	0,252	78
Adsorbat, abgetrennt, 20 Stunden in Wasser suspendiert	0,30	93	0,297	92

Digitized by Google

Dieser Unterschied der Beständigkeit im Hefeauszug und getrennt von ihm wird aber nicht immer gefunden. Bei einer anderen auf übliche Weise dargestellten Autolysenflüssigkeit (Versuch 4) war das Adsorbat gleich haltbar in der Mutterlauge wie getrennt von ihr.

Versuch 4 (Anhang Nr. 114).

	M.Z.Q.	Invertingehalt
Adsorbat, sofort nach Bildung	0,715	—
Dasselbe, 24 Stdn. im acetonhalt. Extrakt .	0,670	94 Proz.
Dasselbe, 24 Stdn. in Wasser suspendiert .	0,657	92 „

Zur Erklärung dieser widerspruchsvollen Beobachtungen tragen besonders zwei Beispiele mit entgegengesetzten Resultaten bei, ein Fall von Unbeständigkeit und einer von Beständigkeit des Adsorbates.

Ein nach dem Verfahren der Neutralextraktion (mit Ammoniak) dargestellter Hefeauszug, acetonhaltig, lieferte ein Adsorbat (Versuch 5), das schon frisch nur 72 Proz. der Invertinwirkung des Extraktes besaß. Rasch abgetrennt und gewaschen, verlor es vom nunmehrigen Enzymgehalt bis zum nächsten Tage wieder 20 Proz.

Versuch 5 (Anhang Nr. 119).

	M.Z.Q.	Invertingehalt
Hefeauszug, 28 Proz. Aceton enthaltend .	3,92	—
Adsorbat, sofort nach Bildung	2,81	72 Proz.
Dasselbe, rasch isoliert, nach 24 Stdn. . .	2,27	57,5 „

Einem anderen Adsorbat, das aus dem ersten Versuche stammte, wurde durch Eluieren mit Ammoniak ein großer Teil vom Invertin entzogen, nämlich soviel als möglich. In diesem Zustande, in dem es noch 26 Proz. von seinem ursprünglichen Invertingehalt hatte, bewahrten wir das Adsorbat, in Wasser aufgeschlämmt, 5 Tage lang auf und fanden (Versuch 6) in dieser Zeit die Invertinwirkung konstant. Der fester gebundene Teil des Invertins war also sehr beständig.

Versuch 6 (Anhang Nr. 120).

Adsorbat, frisch. . . .	M.Z.Q. = 1,45.	
Dasselbe, nach Eluieren	M.Z.Q. = 0,372;	Invertingehalt = 26 Proz.
Dasselbe, nach 5 Tagen .	M.Z.Q. = 0,384;	„ = 26,5 „

Digitized by Google

Das Verhalten des Invertins im Adsorbate ist, wie besonders die Erscheinungen beim Eluieren lehren, verschieden, je nachdem das Invertin unmittelbar oder durch Vermittlung von Koadsorbentien im Aluminiumhydroxyd verankert ist. Davon hängt auch seine Beständigkeit ab. Das Invertin kann auch in einem und demselben Adsorbate zum Teil durch Vermittlung der Koadsorbentien, zum Teil unmittelbar an das Aluminiumhydroxyd gebunden sein, teilweise beständig, teilweise leicht zersetzlich. Im Versuch 6 war nur derjenige Teil im Aluminiumhydroxyd zurückgeblieben, der durch seine Vergesellschaftung mit Begleitstoffen am festesten gebunden ist; diese schützen das Enzym, das Adsorbat ist haltbar. Im Versuch 5 hingegen lag ein Adsorbat vor, dessen Verhalten gegen Eluentien nur mit der Annahme erklärt werden kann (siehe Abschnitt I und IV), daß es keine oder wenig Koadsorbentien enthält. Damit steht im Einklang die auffallende Unbeständigkeit des Invertins im Aluminiumhydroxyd.

Für diese mannigfaltigen Erscheinungen wird also die Erklärung gesucht in der schützenden Wirkung der Begleitstoffe, mit denen das Invertin durch Adsorption verbunden ist. Wenn die Lösungen und Adsorbate an diesen Koadsorbentien verarmen, so wird das Invertin der Zersetzung leichter zugänglich.

5. *Fraktionierte Adsorption.*

Zahlreiche Versuche zielten auf fraktionierte Behandlung der Invertinlösungen mit Aluminiumhydroxyd hin, um im Adsorbat und aus ihm Enzym von möglichst hohem Reinheitsgrad zu erhalten. Der erste Anteil der erforderlichen Adsorbensmenge und die letzten Anteile nehmen meistens mit wenig Invertin viel von den Begleitstoffen auf, so daß es nahe liegt, die erste Fraktion des Adsorbates zu verwerfen und vor der letzten die Adsorption abzubrechen. Bei den Versuchen in großem Maßstab hat sich aber nur das unvollständige Adsorbieren

Digitized by Google

des Invertins, z. B. von 85—90 Proz., bewährt, während für die Entfernung der leichtest adsorbierbaren Nebenprodukte die Vorbehandlung mit Kaolin in acetonhaltiger Lösung gleichmäßiger ausführbar war und mindestens ebenso günstig wirkte. Um z. B. nur $^9/_{10}$ der zur Adsorption nötigen Menge Aluminiumhydroxyd anzuwenden, versuchten wir anfangs, diese vor der Verarbeitung großer Extraktmengen in kleinem Maßstab auszuprobieren. Aber die im kleinen gefundenen Zahlen ließen sich nicht auf die großen Mengen übertragen. Bei Versuchen in großem Maßstab stimmten die im kleinen für die Totaladsorption ausprobierten Mengen Adsorbens nicht und noch weniger der für eine Teiladsorption ermittelte Anteil dieser Menge. Beispielsweise war für einen mit Kaolin vorbehandelten acetonhaltigen Hefeauszug mit 100 ccm-Proben ermittelt worden, daß 16 Proz. von dem im ganzen nötigen Adsorbens nur 3 Proz. vom Invertin aufnehmen. Bei der Wiederholung mit 2 Litern nahmen aber 10 Proz. Adsorbens nicht weniger als 42 Proz. des Invertins auf (Anhang Nr. 121) und in einem Versuch mit 4 Litern adsorbierten 20 Proz. der ausprobierten Adsorbensmenge 53 Proz. vom Invertin (Anhang Nr. 122). Daraus zogen wir die Lehre, in der präparativen Arbeit, wenn z. B. 15—30 Liter Hefeauszug in 6—12 Anteilen verarbeitet wurden, zunächst in einer ganzen $2^1/_2$ Liter-Portion zu bestimmen, wieviel Aluminiumhydroxyd zur Gesamtadsorption nötig war um davon in den übrigen $2^1/_2$ Liter-Portionen 85 bis 90 Proz. anzuwenden. Aber auch die in größerem Maßstab z. B. mit einigen Litern Hefeauszug ausprobierte Teiladsorption ist nicht reproduzierbar, sondern das Ergebnis wird von der Art, wie das Adsorbens eingetragen, wie geschüttelt wird u. dgl., stark beeinflußt.

Die Präparate werden reiner, wenn das Enzym aus dem Hefeauszug nicht vollständig adsorbiert wird. Aber der Erfolg dieser Verbesserung kann durch Störungen beim Eluieren oder durch größere Zersetzlichkeit des

Digitized by Google

Invertins in der Elution leicht, wenigstens teilweise verloren gehen. Z. B. verarbeiteten wir von einem Hefeauszug 25 Liter mit vollständiger Adsorption und gewannen aus dem Adsorbat 13,1 g Invertin vom Zeitwert 5,5; andererseits wurden aus 4 Liter nur 70 Proz. adsorbiert mit dem Ende, daß die Elution ein Präparat vom Zeitwert 2,6 lieferte, aber in viel weniger günstiger Ausbeute (0,4 g).

Das Versuchsmaterial ist zu umfangreich und, da die Hefeauszüge ähnlich wechselnde Beschaffenheit wie die Hefe selbst haben, zu kompliziert, um veröffentlicht zu werden. In der Tabelle 23 sei nur für die fraktionierte Adsorption ein Beispiel angeführt, das den flachen Beginn, sodann das steile Ansteigen und das asymptotische Ende der Adsorptionskurve zeigt. Für die Anwendung von Adsorptionsgesetzen ist die Zusammensetzung der Lösungen und der Adsorbate viel zu kompliziert.

Tabelle 23.

Gang der Adsorption des Invertins (Anhang Nr. 123 und 124).

Aluminiumhydroxyd Proz.	Adsorbiertes Invertin Proz.	Aluminiumhydroxyd Proz.	Adsorbiertes Invertin Proz.
4,5	0	16	3
9	17,5	50	72
18	36,5	66	89
32	70,5	83	96

IV. Elution des Invertins aus dem Tonerdeadsorbat.

1. Elution mit verschiedenen Mitteln.

Das Adsorbat von Invertin in Aluminiumhydroxyd gibt an reines Wasser kein Enzym ab, auch nicht an kohlensäurehaltiges und mit Essigsäure angesäuertes. Eluentien sind in erster Linie Rohrzucker, der das Adsorbat quantitativ zerlegt (vgl. Abschnitt III, 3), in zweiter ein schwach alkalisch reagierendes Salz, nämlich

Digitized by Google

Dinatrium- oder Diammoniumphosphat, in dritter Linie Ammoniak und Ammonoxalat, in vierter Natriumcarbonat und Pyridin. Von den sekundären Phosphaten, die dem Ammoniak weit überlegen sind, machten wir in großem Maßstab seltener Anwendung, weil in diesem Fall die Elution der Dialyse unterworfen werden mußte, ehe man sie fällen oder für eine weitere Adsorption verwenden konnte.

Die Adsorbate verhalten sich je nach den Umständen ihrer Bildung und nach der Entstehung der Invertinlösung verschieden. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Verarbeitung von Hefeauszügen der raschen Autolyse, die mit Aceton verdünnt und mit Kaolin behandelt wurden, mit Aluminiumhydroxyd, das nach quantitativer Aufnahme des Enzyms rasch in der Zentrifuge abgetrennt und dreimal mit Wasser gewaschen wurde. Den Invertingehalt der Elution bestimmten wir in diesem selbst nach der Trennung von der Tonerde unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition.

1. Adsorbat (Anhang Nr. 125).

	Proz. Invertin
Elution mit 1 proz. Na_2HPO_4	79,5
„ „ 1 proz. $(NH_4)_2HPO_4$	78,2
„ „ 0,04 proz. Ammoniak	40,6
„ „ 1 proz. Ammonoxalat[1])	36,5

Das Verhältnis zwischen Soda und Ammoniak ging aus einem Vergleich hervor, in welchem ein Adsorbat zum Teil von 0,018-n Ammoniak, andererseits mit 0,018-n Natriumcarbonat eluiert wurde. Die ammoniakalische Elution enthielt dreimal mehr Invertin als die Sodalösung. In ähnlichem Maße ist Pyridin ungünstiger wie Ammoniak.

Die Adsorbate verbrauchen sofort eine gewisse Menge Alkali, z. B. dasjenige aus 1 Liter Hefeauszug (1 Tl. Hefe und 2 Tle. Wasser) 0,3 g Ammoniak. Sie

[1]) Für diesen Versuch diente eine andere, ähnliche Darstellung des Adsorbates.

Digitized by Google

geben an Alkalilösungen, die zu ihrer Neutralisation nicht genügen, sehr wenig Invertin ab. Wenn aber die Alkalimengen zur Absättigung der Adsorbate ausreichen, so befördert eine Vermehrung die Elution kaum mehr. Es ist daher leicht, bei der Elution im Beständigkeitsbereich des Invertins zu bleiben, das sich nach C. S. Hudson und H. S. Paine[1]) bei 15° bis 0,02-n Hydroxylion erstreckt. Wurde das wie oben dargestellte Adsorbat aus 100 ccm Hefeauszug mit Wasser wieder auf 100 ccm gebracht, so gingen bei 0,002 Proz. Ammoniakgehalt des Wassers (oder noch fünfmal weniger) nur 5—8 Proz. vom Invertin in die Elution über, dagegen in dasselbe Volumen von 0,02 prozentigem Ammoniak 50, von 1 prozentigem 59 Proz. des Invertins. Wiederholte Einwirkung von verdünntem Ammoniak ließ den eluierten Anteil bis auf 65 Proz. ansteigen. Durch Zusatz von Salzen, z. B. von Calciumchlorid oder Ammonacetat, wurde die Elution vermindert und bei größerer Konzentration des Elektrolyten ganz gehemmt. Anders verhält es sich mit phosphorsauren Salzen, z. B. Mononatriumphosphat, das zusammen mit Ammoniak so günstig wie Dinatriumphosphat wirkt.

2. Adsorbat (Anhang Nr. 126).

		Proz. Invertin
1.	Elution mit 0,04 proz. NH_3	42,3
2.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,005 proz. $CH_3CO_2NH_4$	87,5
3.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,05 proz. $CH_3CO_2NH_4$	23,8
4.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,2 proz. $CH_3CO_2NH_4$	0
5.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,005 proz. Asparagin .	38,4
6.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,05 proz. Asparagin .	35,3
7.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,5 proz. Asparagin .	12,7

3. Adsorbat (Anhang Nr. 127).

1.	Elution mit 0,04 proz. NH_3.	54
2.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,005 proz. $CaCl_2$ . .	40
3.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,05 proz. $CaCl_2$ . . .	4
4.	„ „ 0,04 proz. NH_3 u. 1 proz. $CaCl_2$	0

[1]) Journ. Am. chem. Soc. 32, 774, 985, 1220 (1910).

Digitized by Google

4. Adsorbat (Anhang Nr. 128).

	Proz. Invertin
1. Elution mit 0,04 proz. NH_3	47
2. „ ohne NH_3 mit 0,05 proz. NaH_2PO_4	0
3. „ mit 0,04 proz. NH_3 u. 0,05 proz. NaH_2PO_4	60,5
4. „ „ 0,04 proz. NH_3 u. 0,005 proz. NaH_2PO_4	54
5. „ „ 0,05 proz. NH_3 u. 0,5 proz. NaH_2PO_4	82,5
6. „ „ 0,05 proz. NH_3 u. 2 proz. NaH_2PO_4	81,7
7. „ „ 1 proz. NH_3 u. 0,5 proz. NaH_2PO_4	41

Diese Versuche bedeuten nur eine Vorarbeit für die präparativen Zwecke. Sie lassen sich mit reineren Präparaten nicht ohne weiteres exakter gestalten, weil für das beschriebene Verhalten des Invertins beim Eluieren eben seine Beimischungen mitverantwortlich sind.

2. *Einfluß der Koadsorbentien und Koeluentien.*

Die Begleitstoffe des Invertins wirken bei seiner Adsorption und noch viel mehr bei der Elution aus dem Adsorbate mit. Sie sind nach der Rolle, die sie spielen, wie im I. Abschnitt dieses Kapitels ausgeführt wurde, als Koadsorbentien und Koeluentien zu unterscheiden.

Verhalten der durch rasche Autolyse gewonnenen Hefeauszüge.

An der Elution mit verdünntem Ammoniak sind Begleitstoffe beteiligt. Wird der Hefeextrakt einer Vorreinigung mit Bleiacetat, die weitergehend als die mit Kaolin ist, unterworfen, so fehlen diese Begleiter. Unter gleichen Bedingungen wie sonst entstehen mit Aluminiumhydroxyd Adsorbate, die durch Ammoniak nicht eluiert werden. Sekundäre Phosphate, die das Ammoniak in der Wirkung auf die Adsorbate übertreffen, legen auch in diesem Falle Invertin aus dem Aluminiumhydroxyd frei.

1. Versuch. Der Hefeauszug wurde mit überschüssigem Bleiacetat vollständig gefällt; nach der Entfernung des Bleies mit Schwefelwasserstoff führten wir aus acetonhaltiger Lösung das Invertin quantitativ in Adsorbat

Digitized by Google

über. Dieses gab an 0,04 prozentiges Ammoniak nur eine Spur Invertin ab.

2. Versuch. Ein anderer Hefeauszug, mit Kaolin gereinigt, lieferte nach dem beschriebenen Verfahren ein Adsorbat, das mit Ammoniak in normaler Weise eluiert wurde; die Elution enthielt etwa 40 Proz. vom Invertin der Enzymlösung.

Von diesem Extrakt wurde ein Teil mit Bleiacetat gereinigt (500 ccm mit 14 g Bleiacetat); bei der Ausfällung des Bleiüberschusses und Klärung durch Kieselerde verlor die Lösung 25 Proz. vom Invertin. Nach Zusatz von 40 Proz. Aceton adsorbierten wir das Invertin vollständig mit Aluminiumhydroxyd. Das Adsorbat wurde geteilt. Ein Anteil gab an 0,04 prozentiges Ammoniak höchstens 1 Proz. vom Invertin der angewandten Lösung ab; nach Abtrennung der Elution enthielt das Aluminiumhydroxyd noch 61 Proz. des Invertins. Ein anderer Teil des Adsorbates lieferte mit 1 prozentigem Diammonphosphat eine Elution, die 66 Proz. vom Invertin des Extraktes enthielt (Anhang Nr. 129).

3. Versuch. Eine andere Hefeflüssigkeit der raschen Autolyse wurde zum Teil mit Bleiacetat gereinigt. Das Adsorbat daraus gab an 0,04 prozentiges Ammoniak nur 3 Proz., hingegen an 1 prozentiges Diammonphosphat 40 Proz. vom Invertin des Hefeauszuges ab (Anhang Nr. 130).

Der übrige Teil des Extraktes wurde ohne Bleiacetat und ohne Kaolinbehandlung, aber mit Aceton verdünnt, zur Adsorption verwendet. Aus dem Adsorbat eluierte 0,04 prozentiges Ammoniak 49 Proz. des Invertins (Anhang Nr. 131.)

4. Versuch. Nicht so eindeutig sind Erscheinungen zu erklären, die bei der Adsorption aus acetonfreien, ungereinigten Hefeauszügen beobachtet wurden. Ein so gewonnenes, dreimal mit Wasser gewaschenes Adsorbat schickte bei der Elution mit 0,05 prozentigem Ammoniak nur ein Drittel der gewöhnlichen Menge, nämlich 14 Proz.

Digitized by Google

des Invertins (bezogen auf den Hefeauszug) in Lösung (Anhang Nr. 132). Da das Aluminiumhydroxyd aus der wäßrigen Lösung mehr von organischen Verbindungen aufnimmt als aus der acetonhaltigen, so ist es möglich, daß in diesem Falle im Adsorbat die Stoffe vermehrt sind, die das Invertin an die Tonerde binden. Es kann aber auch sein, daß Koeluentien in der wäßrigen Lösung zurückbleiben, die aus acetoniger mit in das Aluminiumhydroxyd gehen.

5. Versuch. Wird aber das Invertin einer Elution nach dem Verjagen des Ammoniaks im Vakuum zum zweiten Male in wäßriger (acetonfreier) Lösung durch Aluminiumhydroxyd adsorbiert, so verhält sich das Adsorbat normal. Es gibt das Invertin an Ammoniak ab; wir fanden 40 Proz. in der Elution (Anhang Nr. 133).

6. Versuch. Noch schwerer eluierbar ist das Invertin in einem aus ammoniakhaltigem, acetonfreiem Hefeauszug gebildeten Adsorbat. In einem Falle enthielt die ammoniakalische Elution aus einem solchen Adsorbat gar kein Invertin. In einem anderen Falle wurden 2,5 Proz. des Invertins durch Ammoniak eluiert, bei wiederholter Elution noch 1 Proz. (Anhang Nr. 134.) Hingegen nahm Diammonphosphat die normale Menge Invertin, 48 Proz., auf.

Wenn auch hier wie beim 4. Versuch verschiedene Erklärungen möglich sind, so ist die Annahme unumgänglich, daß Begleitstoffe für diese Erscheinung verantwortlich sind.

Verhalten der durch Neutralextraktion dargestellten Hefeauszüge.

Die Erscheinungen sind hier umgekehrt wie bei unseren gewöhnlichen Invertinlösungen. Das Adsorbat aus dem acetonhaltigen Neutralextrakt ist nicht durch Ammoniak eluierbar, wird es aber dadurch, daß man aus dem Extrakt zuerst mit Bleiacetat Eiweißkörper be-

Digitized by Google

seitigt und dann adsorbiert. Man könnte diese Beobachtung, wenn sie für sich allein stände, durch Vorhandensein von Koadsorbentien und Fehlen derselben nach der Bleiacetatfällung zu erklären suchen. Die verschiedenen Beobachtungen, die hier angeführt werden, machen aber in ihrer Gesamtheit die Erklärung wahrscheinlicher, daß das Adsorbat aus dem Neutralextrakt an Koeluentien arm ist, und daß das Adsorbat infolge der Reinigung auch Koeluentien verloren hat, infolgedessen das Invertin lockerer gebunden enthält. Die Koadsorbentien des Neutralextraktes können nicht identisch sein mit denen im sauer gebildeten Hefeauszug. Sie sind im ersteren Falle durch Bleiacetat fällbar, im letzteren *nicht*.

7. Versuch. Ein mit Diammonphosphat und Toluol dargestellter Hefeauszug lieferte ohne Vorbehandlung ein Adsorbat mit $Al(OH)_3$, das an 0,04 prozentiges Ammoniak sehr wenig Invertin abgab. Die Elution bewirkte in 15 Minuten langer Einwirkung auf Rohrzucker nur spurenweise Bildung von reduzierendem Zucker.

8. Versuch. Ein unter Neutralisation mit Ammoniak dargestellter Hefeauszug gab ohne Vorbehandlung ein Adsorbat, dem Ammoniak 2 Proz. des Invertins entzog (Anhang Nr. 135). Denselben Extrakt behandelten wir mit so viel Bleiacetat, daß etwas Blei im Filtrat nachzuweisen war, daß aber mit mehr Bleiacetat noch eine weitere Fällung entstanden wäre. Nun lieferte die Invertinlösung mit Aluminiumhydroxyd ein Adsorbat, das an 0,04 prozentiges Ammoniak 60 Proz. vom Invertin des gereinigten Extraktes abgab.

War derselbe Extrakt mit Bleiacetat vollständig gefällt worden, so konnten dem Adsorbat mit Ammoniak 37 Proz. Invertin entzogen werden.

9. Versuch. Ein anderer mit Ammoniak dargestellter Extrakt wurde gleichfalls vollständig mit Bleiacetat gefällt. Das Adsorbat daraus lieferte eine ammoniakali-

Digitized by Google

sche Elution, die 18 Proz. des Invertins enthielt (Anhang Nr. 136).

10. Versuch. Mit einem gleichartigen Hefeauszug wurde der Versuch wiederholt. Die ammoniakalische Elution enthielt 28 Proz., hingegen eine mit 1 prozentigem Ammonphosphat gebildete 50 Proz. vom Invertin (Anhang Nr. 137).

11. Versuch. Daß das abweichende Verhalten der unter Neutralisation dargestellten Invertinlösung nicht auf ihrem Ammoniakgehalt beruht, zeigte die Eluierbarkeit des Adsorbates aus dem nach Hudson gewonnenen und mit Ammoniak versetzten Hefeauszug. Aus der acetonhaltigen Lösung wurde bei einem Gehalt von 0,1 Proz. NH_3 das Adsorbat dargestellt. Es war so leicht eluierbar, daß schon beim Waschen des Adsorbates infolge seines Ammoniakgehaltes 23,5 Proz. des Invertins abgegeben wurden, während das Adsorbat 43 Proz. vom Invertin behielt (Anhang Nr. 138).

V. Adsorption durch Calciumphosphat und Elution.

Invertin wird von tertiärem Calciumphosphat adsorbiert und läßt sich durch Umwandeln des Niederschlages in sekundäres Phosphat eluieren.

Werden Hefeauszüge mit Diammonphosphat, Calciumchlorid und Ammoniak versetzt, so enthält der amorphe Niederschlag nach einigem Stehen das Enzym. Für die Mehrzahl der Versuche unterwarfen wir das Invertin zuvor der Reinigung mit Aluminiumhydroxyd. Die mit sekundärem Alkaliphosphat gewonnene Elution wird von Calciumchlorid gefällt, ohne daß Invertin in die Fällung übergeht. Als wir hingegen die Elution nach Zusatz von Ammoniak mit Calciumchlorid fällten, adsorbierte der voluminöse, plastische Niederschlag das Invertin entweder quantitativ oder zum großen Teil. Dieses Adsorbat gibt an Ammoniak und an sekundäres Phosphat kein und an verdünnte Essigsäure (0,02-n) wenig Invertin

Digitized by Google

ab. Verwandelt man aber den Niederschlag in sekundäres Calciumphosphat, so geht das Enzym daraus vollständig in Lösung. Das enzymhaltige Tricalciumphosphat wurde abfiltriert, in Wasser suspendiert und mit überschüssigem Mononatriumphosphat versetzt. Darauf verwandelte es sich in einer oder in zwei Stunden in kompaktes und krystallinisches Dicalciumphosphat, das kein Invertin zurückhielt. Als Ausgangsmaterial für die quantitativen Bestimmungen dienten Tonerdeadsorbate aus Neutralextrakten, die wir mit Diammonphosphat eluierten.

(Anhang Nr.		139	140	141)
Angewandte Invertinlösung . .	M.Z.Q.	3,38	2,86	4,15
Elution aus Calciumphosphat . .	M.Z.Q.	3,38	1,98	3,62
Invertinausbeute	Proz.	100	70	87

Leider war in diesen, im präparativen Maßstab untersuchten Beispielen weder die Adsorption noch die Elution in genügendem Maße selektiv. Nachdem die Elutionen vom überschüssigen primären Phosphat durch Dialyse befreit waren, ergaben die Bestimmungen nur Zeitwerte von 4,55, 5,4 und 6,4.

VI. Adsorption des gereinigten Invertins durch Kaolin und Elution.

Das aus dem Tonerdeadsorbat eluierte Invertin, und zwar erst dieses, ist adsorbierbar durch Kaolin. Durch die Behandlung mit Aluminiumhydroxyd ist das Enzym von den Koadsorbentien, Begleitstoffen überwiegend saurer Natur, abgetrennt worden, mit denen es zuvor assoziiert war. Es zeigt in diesem Reinheitsgrad das Verhalten eines amphoteren Stoffes und wird nun sowohl von elektronegativen wie elektropositiven Adsorbentien aufgenommen.

Es ist nicht nötig, die Adsorption wie beim Aluminiumhydroxyd durch Beimischung von Aceton oder einem anderen organischen Lösungsmittel zu befördern; das Invertin ist auch schon so arm an Schutzstoffen,

Digitized by Google

daß es in den organischen Solventien rasch verderben würde. Das Adsorptionsvermögen des Kaolins wird erhöht, wenn man es stundenlang in 20 prozentiger Salzsäure erhitzt und durch häufiges Dekantieren mit destilliertem Wasser auswäscht, wobei es sich schließlich kolloid verteilt. Die zur Adsorption anzuwendenden Kaolinmengen erscheinen im Vergleich mit der Vorbehandlung der Hefeauszüge viel größer, wenn man sie auf Trockengewichte der Lösungen bezieht, aber viel geringer im Verhältnis zu den Invertingehalten. Wir behandelten zum Beispiel die mit Ammoniak dargestellte und einige Tage dialysierte Elution aus dem Tonerdeadsorbat, die neutral reagierte, mit Kaolin; eine Elution vom M.Z.Q. 0,7, ca. 0,25 g Trockensubstanz in 130 ccm enthaltend, gab an 10 g Kaolin 84 Proz. des Invertins (Anh. Nr. 142) ab und verlor auf Zusatz von nochmals derselben Menge Kaolin das Invertin gänzlich. Diese Adsorption wurde durch zwei Umstände wesentlich verbessert und die erforderliche Kaolinmenge herabgemindert: Anstatt der Elutionen unterwarfen wir die durch Fällung mit Aceton daraus isolierten Invertinpräparate, die namentlich große Mengen von Ammoniumsalzen in der Mutterlauge zurückließen, der Adsorption. Ferner erfolgt diese viel leichter in schwach essigsaurer Lösung, z. B. in 0,04 normaler, für die nur etwa $^1/_5$ der Kaolinmenge wie für entsprechende neutrale Lösnngen erforderlich ist.

Die Adsorption durch Kaolin führt zu einer Methode der Trennung vom Hefegummi, der in seiner ganzen Menge in der Mutterlauge znrückbleibt. Für die Steigerung der Enzymkonzentration ist dies von großer Bedeutung. Denn wir fanden beispielsweise in einem durch Aluminiumhydroxyd gereinigten Invertinpräparat 65 bis 75 Proz. Hefegummi, H. v. Euler und O. Svanberg[1]) noch mehr in ihren letzten Invertinpräparaten, die bei der

[1]) Siehe Kap. A, Abschn. VIII.

Digitized by Google

Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure 75—92 Proz. Monose lieferten. Nach der Elution aus dem Kaolin gibt das Invertin mit Fehlingscher Lösung keinen Niederschlag, und bis zu zweistündigem Kochen mit 20 prozent. Salzsäure bewirkt es keine Reduktion der Fehlingschen Lösung. In der Mutterlauge von der Kaolinbehandlung finden sich außer dem Hefegummi noch Ammonsalze, wenig Eiweiß, mitunter etwas Aminosäure.

Aus dem Kaolinadsorbat läßt sich das Invertin durch sekundäres Alkaliphosphat, Natriumcarbonat oder Ammoniak eluieren. Am besten gelingt die Elution durch Suspendieren des Adsorbates in Wasser und Versetzen mit so viel 0,2 n-Sodalösung, bis die Flüssigkeit alkalisch zu reagieren beginnt. Das Kaolin wird dabei zum Teil kolloid und die Elution ist kaum filtrierbar. Die Klärung wird erreicht, indem man die Hauptmenge des Kaolins mit der Zentrifuge abtrennt und die trübe Elution auf der Nutsche durch eine Schicht von geglühtem Kieselgur absaugt. Nach vergleichenden Bestimmungen tritt dabei kein Verlust an Invertin ein.

Die Ausbeuten, für die einige Beispiele in der Tabelle 24 angeführt sind, leiden, wenn die Kaolinadsorbate nicht rasch genug verarbeitet werden, da das Enzym in ihnen allmählich in unwirksame Form übergeht. Aus einem 48 Stunden aufbewahrten Adsorbat war nur noch ein Viertel des angewandten Invertins zu gewinnen. Die wahren Ausbeuten bei der Reinigung durch Kaolin sind in einigen Fällen höher als die in der Tabelle verzeichneten, denn die angewandten Invertinlösungen waren nach dem Filtrieren von ein wenig unlöslich gewordener Substanz mitunter etwas schwächer als gemäß den hier verzeichneten Bestimmungen der Präparate; und es kam vor (Vers. 4), daß die Elution aus dem Kaolin erst nach Stehen und Eindampfen bestimmt wurde. In günstigen Fällen erreichte die Ausbeute bei der Adsorption und Elution zwei Drittel des angewandten Enzyms.

Digitized by Google

Tabelle 24.

Ausbeute bei der Elution aus dem Kaolinadsorbat.

Nr.	Angew. Invertin		Kaolinmenge	M.Z.Q. des angew. Invertins	M.Z.Q. der Elution	Invertinausbeute
	g.	Zeitwert	g			Proz.
1. (Anh. Nr. 143)	0,92	2,8	27,4	6,58	4,18	63
2. (Anh. Nr. 144)	7,47	6,0	217	25,0	17,7	70
3. (Anh. Nr. 145)	3,5	4,5	83	13,6	9,3	68
4. (Anh. Nr. 146)	4,4	2,5	72,5	32,0	15,3	48
5. (Anh. Nr. 147)	17,6	4,7	270	75	29,8	40
. (Anh. Nr. 148)	ca. 4	8	150	7,0	4,1	58

Auch andere elektronegative Adsorbentien nehmen das aus dem Tonerdeadsorbat eluierte Invertin auf. Wir beobachteten mit gefällter und sorgfältig ausgewaschener Kieselsäure quantitative Adsorption, desgleichen mit dem durch Elektroosmose dargestellten Kieselsäurepräparat Osmosil[1]), dessen Adsorptionsvermögen etwa viermal geringer war. Hingegen adsorbierte Mastix, wovon ebensoviel wie vom Kaolin angewandt wurde, Invertin von demselben Reinheitsgrad gar nicht.

VII. Zur Dialyse der Invertinlösungen.

Die Dialyse der Invertinlösungen wurde außer in den älteren Angaben von W. A. Osborne[2]), M. Kölle[3]) und B. Hafner[4]) in den Arbeiten von C. S. Hudson und H. S. Paine[5]) und C. S. Hudson[6]), sowie in eingehenden Untersuchungen von H. v. Euler und O. Svan-

[1]) Siehe L. Michaelis, Berl. klin. Wochenschr. 1918, 710; R. Willstätter, diese Annalen 422, 65 (1920/21).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 399 (1899).

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 429 (1900).

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 1 (1904).

[5]) Journ. Am. chem. soc. 32, 774 (1910).

[6]) Journ. Am. chem. soc. 36, 1566, 1569 (1914).

Digitized by Google

berg[1]) behandelt. Bei Hudson ist nach der Ausfällung von Eiweiß mit Bleiacetat und von Blei mit Schwefelwasserstoff die rasche Entfernung der Essigsäure durch Dialyse geboten, die in Kollodiumhülsen vorgenommen wird. Euler und Svanberg streben durch die Dialyse die Entfernung stickstoffhaltiger Verunreinigungen an; Hand in Hand damit geht eine Aktivitätssteigerung von beispielsweise 12, 39, 40 und 16 Proz. Svanberg beobachtete dabei großen Enzymverlust, z. B. 43 Proz., und führte ihn auf die Durchlässigkeit der Kollodiumhülsen für Invertin zurück. Euler und Svanberg zeigten aber vor kurzem, daß in einer Reihe von Dialysen die Saccharaseverluste, die 10—20 Proz. betrugen, nicht auf der Durchlässigkeit der Membran für das Enzym beruhten und auch nicht auf der Dialysierbarkeit eines Koenzyms. Es wird daher anzunehmen sein, daß das Invertin sich partiell zersetzt. Dies kann eher bei dem herausdiffundierten als bei dem im Dialysator zurückgebliebenen, durch Kolloide mehr geschützten Invertin der Fall sein.

Auch in unseren Versuchen wurden anfangs immer die nach Hudson dargestellten Kollodiumhülsen angewandt. Dabei trat in allen Fällen Verlust an Invertin ein, der sich zwischen 20 und 33 Proz. bei 1—2tägiger Dauer der Dialyse gegen fließendes Wasser bewegte.

Eine nach der Reinigung mit Aluminiumhydroxyd und darauffolgende Adsorption durch Calciumphosphat dargestellte Mononatriumphosphatelution wurde 20 Stunden dialysiert. Dabei ging M.Z.Q. von 3,38 auf 2,77 zurück, entsprechend einem Verlust an Invertin von 18 Proz. (Anh. Nr. 149).

Eine zweite Elution von ähnlicher Darstellung wurde 48 Stunden dialysiert; M.Z.Q. anfangs 3,61, am Ende 2,42,

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 269 und zwar 303 (1919); O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 65 u. zwar 90 (1920): H. v. Euler u. O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **110**, 175 (1920).

Digitized by Google

Verlust an Invertin 33 Proz. (Anh. Nr. 150). Im umgebenden Wasser ließ sich Invertin nachweisen. Aber nach den Angaben von Euler und Svanberg dürfte auf das Herausdiffundieren allein nur ein Teil des Enzymverlustes zurückzuführen sein.

Die Erklärung der Invertinabnahme bei der Dialyse sollte wohl auch berücksichtigen, daß die Reinheit der Invertinlösungen darauf Einfluß haben kann. Hudson hat nämlich in zahlreichen Bestimmungen gefunden, daß bei der Dialyse seiner Präparate, deren Reinigung lediglich in Eiweißbeseitigung bestand, kein Verlust eintrat; geringe Invertinabnahmen könnten dabei übersehen worden sein. Die Präparate von Euler und Svanberg waren reiner, sie waren durch Entfernung von Eiweiß mit Kaolin und fraktionierter Fällung mit Alkohol gereinigt, die unseren noch weitergehend durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Elution. Wahrscheinlich hat die Abtrennung der Begleitstoffe, die eine Schutzwirkung ausüben können, zwei Folgen: verminderte Beständigkeit und erhöhtes Diffusionsvermögen des Invertins.

Es gelingt uns, durch Anwendung von weniger durchlässigen Dialysatoren, von tierischen Membranen, langdauernde Dialyse ohne Invertinverlust durchzuführen. Allerdings auch unter Bedingungen, unter welchen Invertin völlig beständig sein kann, erleidet es manchmal Einbuße an Wirksamkeit, also teilweise Zersetzung. Die Ursachen sind noch nicht genügend bekannt. Wir fanden in vielen quantitativen Versuchen, daß Invertinlösungen dialysiert, aufbewahrt, eingedampft werden können, ohne Änderung der Zeitwerte. Dennoch beobachteten wir bei jeder dieser Maßnahmen mitunter kleine oder erhebliche Invertinverluste.

Bei reineren Invertinlösungen erweist sich die Kollodiummembran für die Dialyse als ungeeignet; wir ziehen die schon von E. Starkenstein[1]) angewandten sog. Fischblasen vor, in denen 250—300 ccm dialysiert

[1]) Biochem. Ztschr. 24, 210 (1910).

Digitized by Google

werden können. Unter unseren Versuchsbedingungen war eine 1 prozentige Mononatriumphosphatlösung in $1^1/_2$—2 Tagen frei von Phosphat. Die Tabelle 25 zeigt, daß es auf diese Weise möglich ist, aber nicht immer gelingt, die schon weitgehend gereinigten und daher empfindlichen Invertinpräparate der Elutionen aus dem Kaolinadsorbat ohne Verlust zu dialysieren. Die Elutionen waren von 2 Litern anfänglichem Volumen auf 300 ccm eingeengt und mit Toluol versetzt.

Tabelle 25.

Invertingehalt der dialysierten Elutionen.

Nr.	Dauer der Dialyse	M.Z.Q. vor der Dialyse	M.Z.Q. nach der Dialyse	Abnahme Proz.
1. (Anh. Nr. 151)	3 Tage	8,15	8,07	1
2. (Anh. Nr. 152)	2 „	14,5	11,0	24
3. (Anh. Nr. 153)	6 „	5,25	5,15	2
4. (Anh. Nr. 154)	6 „	11,7	11,1	5
5. (Anh. Nr. 155)	5 „	2,7	2,8	0
6. (Anh. Nr. 156)	3 „	3,1	2,68	14

Diese Dialyse wenden wir zu präparativen Zwecken an, um aus den Elutionen die anorganischen Salze zu entfernen, die Alkaliphosphate gewisser Elutionen aus Tonerdeadsorbat, das Natriumcarbonat aus der Kaolinelution. Die hellbräunlichen Lösungen werden dabei farblos und verlieren ihren noch an Hefeextrakt erinnernden Geruch. Mit dieser Entfernung der dialysierenden Begleitstoffe konnte eine Steigerung des Reinheitsgrades um etwa 30 Proz. erzielt werden. Z. B. verbesserte sich der Zeitwert eines aus Kaolinadsorbat isolierten Präparates bei 6 tägiger Dialyse von 0,8 auf 0,55.

VIII. Verhalten der Invertinlösungen gegen Uranylacetat.

Die nach den Adsorptionsmethoden gereinigten Invertinpräparate gaben mit Uranylacetat Niederschläge. Die Fällung läßt sich derart ausführen, indem man rasch

Digitized by Google

mit überschüssiger Uranlösung versetzt, daß das Invertin ganz oder zum größten Teil adsorbiert wird, oder bei vorsichtigem Zusatz von Uranylacetat unter Vermeidung eines Überschusses so, daß es zum großen Teil in der Mutterlauge hinterbleibt. Auf beide Arten läßt sich das Invertin weiter reinigen. Der präparativen Anwendung des Verfahrens waren aber mehrere Umstände hinderlich. Das mit Aluminiumhydroxyd, dann mit Uranylacetat gereinigte Invertin ließ sich zwar weiterhin von Kaolin quantitativ absorbieren, aber aus dem Adsorbat schlecht durch Ammoniak eluieren. Wurde aber zuerst das Tonerde- und Kaolinverfahren ausgeführt und eines der reinsten Invertinpräparate der Uranylacetatbehandlung unterworfen, so erwies sich das wieder isolierte Invertin als besonders unbeständig, so daß schon beim Stehen der Lösung Abnahme der Wirksamkeit eintrat und der gefundene Zeitwert nicht dem theoretisch berechneten entsprach. Übrigens war auch das Verhalten der aus Kaolinadsorbaten gewonnenen Elutionen gegen Uranylacetat infolge ihres schwankenden Gehalts an Begleitstoffen zu ungleichmäßig. Es kam vor, daß Elutionen anfangs durch Uranacetat fällbar waren, aber nicht mehr nach der Dialyse. Auch der umgekehrte Fall wurde beobachtet: Elutionen aus Kaolinadsorbaten waren nicht fällbar mit Uranylacetat, aber nach der Dialyse gaben sie Niederschläge mit diesem Reagens.

Versuche mit Elution aus Tonerdeadsorbat. Beim Versetzen mit einem Überschuß von Uranylacetat entstand ein gelblicher, flockiger Niederschlag, der alles Invertin adsorbiert enthielt. Die Fällung gab an verdünnte Sodalösung zusammen mit wenig Uran das Enzym zum großen Teil ab. Um aber hauptsächlich die Beimischungen des Invertins auszufällen, verarbeiteten wir 2,5 g eines Präparates vom Zeitwert 3,3 mit einer zur Fällung nicht ausreichenden Uranmenge. Bei vorsichtigem Zusatz einer 2 prozentigen Uranylacetatlösung,

Digitized by Google

wovon 80 ccm angewandt wurden, entstand ein reichlicher Niederschlag, der sich gut abfiltrieren ließ. In der Mutterlauge waren 77 Proz. vom Invertin (Anh. Nr. 157); in einem anderen Versuch 84 Proz. (Anh. Nr. 158). Nach der Dialyse enthielt die Lösung 0,8 g Invertin vom Zeitwert 1,45. Sie gab keine Ninhydrinreaktion mehr, die Xanthoproteinreaktion nur schwach, enthielt aber reichlich Hefegummi. In diesem Zustand wurde das Invertin vollständig adsorbiert von Kaolin, aber nur 25 Proz. daraus mit Ammoniak eluiert.

Versuch mit Elution aus Kaolinadsorbat. 0,5 g eines Präparates vom Minutenwert 0,7 wurden in zwei Hälften verarbeitet.

1. Beim Fällen mit überschüssigem 2 prozentigen Uranylacetat (80 ccm) nahm der Niederschlag das Invertin gänzlich auf. Wir eluierten ihn zweimal mit 0,01 n-Natriumcarbonat und fanden in der durch längeres Zentrifugieren geklärten Elution 55 Proz. (Anh. Nr. 159) des angewandten Enzyms (in einer dritten Elution weitere 10 Proz.). Diese Lösung bildete bei der Dialyse einen uranhaltigen Niederschlag, der 30 Proz. des Invertins der Elution einschloß. Die davon abfiltrierte Flüssigkeit enthielt Invertin von ungünstigerem Zeitwert, nämlich 1,4. Beim Stehen in einem Kolben aus Jenaer Glas verdarb die mit Toluol versetzte Invertinlösung allmählich, obwohl sie klar blieb. In drei Wochen verschlechterte sich der Zeitwert auf 1,96.

2. Um aus der Invertinlösung hauptsächlich Begleitstoffe zu fällen, versetzten wir sie unter Rühren langsam mit 32 ccm Uranlösung. Die Mutterlauge von dem entstandenen Niederschlag enthielt noch 51 Proz. des Invertins (Anh. Nr. 160). Bei 6 tägiger Dialyse ging M.Z.Q. von 2,9 auf 2,3 zurück. Der Zeitwert des Präparates betrug nun 1,2, erhöhte sich beim Stehen im Jenaer Kolben in drei Wochen auf 1,7 durch Zersetzung von etwa 30 Proz.

Digitized by Google

C. Invertinpräparate.[1])

I. Einleitung.

Um die chemische Art eines kohlehydratspaltenden Enzyms der Hefe kennen zu lernen, müssen Wege für seine Trennung von einem Vielfachen an Begleitstoffen aus den Klassen der Proteine und der Kohlehydrate aufgesucht und die Bedingungen ermittelt werden, unter denen das mit zunehmender Reinheit zunehmend empfindliche Enzym konstante Wirkung behält. Die Literatur verzeichnet viele wertvolle Untersuchungen über die Darstellung von Invertin hohen Reinheitsgrades, unter welchen die genauen Angaben von H. v. Euler und seinen Mitarbeitern hervorragen. Während H. v. Euler und O. Svanberg der Lösung des Problems durch Züchtung enzymreicher Hefe zu Hilfe kommen, arbeiten wir an neuen präparativen Methoden, mit denen die Abtrennung der Eiweißstoffe und des Hefegummis gelingt.

Die besten Invertinpräparate[2]) sind von J. Meisenheimer, C. S. Hudson und H. v. Euler und O. Svanberg dargestellt worden.

C. S. Hudson hat für seine Invertinpräparate keine Angaben veröffentlicht, die dem Zeitwert nach C. O'Sullivan und F. W. Tompson entsprechen. Indem wir aber Invertin sowohl unter den Bedingungen von Hudson wie unter den Verhältnissen der Zeitwertdefinition messen (Kap. A, Abschn. IV, 7), finden wir einen Schlüssel zum Vergleich der Präparate von Hudson mit denen von Euler und mit den unseren. Es scheint, daß das dialysierte Invertin von Hudson[3]) etwa den Minutenwert 3 erreicht.

J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper[4]) verarbeiteten durch geeignete Ernährung enzymreich ge-

[1]) Über das experimentelle Material finden sich ausführlichere Angaben in der gedruckten Dissert. von F. Racke, München 1920.

[2]) Siehe die kritische Übersicht von H. v. Euler und O. Svanberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 269 und zwar 303 (1919).

[3]) Journ. Am. chem. soc. 36, 1566 (1914).

[4]) Biochem. Ztschr. 54, 122 (1913).

Digitized by Google

züchtete Hefe. Aus dem Preßsaft erhielten sie nach Ausfällung von Begleitstoffen durch Säure Präparate vom Zeitwert 21, wohl auch etwas bessere. Durch Anwendung der Autolysenverfahren wird dieses Ergebnis übertroffen.

H. v. Euler und O. Svanberg[1]) verdanken ihren Erfolg gleichfalls sehr invertinreich gezüchteter Hefe (Zeitwert 100 bis 90). Durch Beseitigung der Eiweißstoffe mit Kaolin und fraktionierte Fällung durch Alkohol gewannen sie Invertinpräparate, von denen das beste den Zeitwert 3,5 aufwies. So dargestellt, enthält das Invertin sehr viel Hefegummi.

Wir waren durch die Zeitverhältnisse gezwungen, mit ungünstiger Hefe zu arbeiten (Zeitwert 350 bis 250). Die Isolierung des Invertins erfolgt im wesentlichen durch Adsorption mit Aluminiumhydroxyd und Eluieren und darauffolgende Adsorption mit Kaolin und nochmaliges Eluieren. Nach der ersten Elution entspricht das Invertin dem Zeitwert 5 bis 2,5, nach der zweiten Zeitwerten von 0,85 bis 0,55. Die Ausbeute betrug ungefähr ein Viertel vom Invertin der Hefe.

II. Verfahren der Adsorption mit Aluminiumhydroxyd.

1. *Fraktionierte Adsorption.*

Das Ausgangsmaterial war ein durch rasche Autolyse unter Toluolzusatz (1 Teil Hefe, 2 Teile Wasser) gewonnener Hefeauszug vom Zeitwert 250 (auf die Hefe bezogen). 14,75 Liter wurden mit 5,9 Liter, d. i. 40 Proz. Aceton vermischt und mit 1,5 kg gemahlenem Kaolin einige Minuten verrührt und über Nacht stehen gelassen. Dann konnte ein großer Teil der Flüssigkeit abgehebert werden, der Rest wurde filtriert. Bei dieser noch unvollkommenen Entfernung der Eiweißkörper gingen 10 Proz. des Invertins verloren. Vom Filtrat (16 Liter) diente ein Anteil von 2,7 Liter zur Bestimmung der Ton-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 107, 269 (1919).

Digitized by Google

erdemenge, die für die Adsorption von etwa 90 Proz. des Invertins erforderlich war, und die Hauptmenge (13,5 Liter; M.Z.Q. 52,3) wurde dann in fünf ebenso großen Anteilen mit Aluminiumhydroxyd bearbeitet. Von 8,3 g Aluminiumhydroxyd wurden in der Vorprobe 71 Proz. des Invertins adsorbiert; danach war vom Adsorbens etwa 20 Proz. mehr anzuwenden. Die 5 Portionen wurden mit Aluminiumhydroxydsuspension, für jede 10,7 g $Al(OH)_3$ enthaltend, in dünnem Strahl unter ständigem Umschütteln versetzt und eine halbe Stunde stehen gelassen. Das Adsorbens nahm nun 88 Proz. vom Invertin auf. Einfacher ist es, in der Vorprobe, die aber nicht viel kleiner genommen werden darf, zu bestimmen, wieviel Tonerde zur annähernd quantitativen Adsorption nötig ist und davon in der Hauptmenge $^4/_5$ anzuwenden.

Vom Adsorbat läßt sich die Mutterlauge zum großen Teil dekantieren. Die übrig bleibende Suspension (4 Liter) verarbeiteten wir in einer Zentrifuge von gegen 2 Liter Gläserinhalt. In den Zentrifugengläsern wurde das gesammelte Adsorbat dreimal gewaschen durch Anrühren mit destilliertem Wasser und erneutes Zentrifugieren. Dann spülten wir das Tonerdeadsorbat in einen Kolben und versetzten die Suspension, deren Volumen 1700 ccm betrug, unter kräftigem Schütteln mit $5^1/_2$ ccm 10prozentigem Ammoniak. Die rasch gebildete Elution wurde zum Teil auf einige Nutschen gegeben und auf gehärtetem Filtrierpapier abgesaugt, zum Teil in der Zentrifuge annähernd geklärt und auf die nämlichen Filter nachgefüllt, da die ammoniakalische Elution durch Zentrifugieren allein nicht klar erhalten und danach für sich allein nicht klar filtriert werden konnte. Auch das fast wasserklare Filtrat pflegte noch etwas kolloides Aluminiumhydroxyd zu enthalten, das erst bei starkem Einengen ausflockte. Die Arbeit muß so geleitet werden, daß man in einem Tage bis zum Absaugen der Hauptmenge der Elution kommt, wenn auch nicht mehr zum Nachwaschen auf der Nutsche.

Digitized by Google

Das Filtrieren der Elution würde durch Kieselgur oder Klärerde sehr erleichtert, aber dabei findet Verlust von Invertin durch Adsorption statt; bei der späteren Elution aus dem Kaolinadsorbat wird hingegen von Kieselgur kein Verlust bewirkt.

Die ammoniakalische Elution (1850 ccm) enthielt 47 Proz. vom Invertin (M.Z.Q. 24,8) des mit Kaolin behandelten Hefeauszuges. Sie wurde bei einer Destillationstemperatur von höchstens 25° unter starker Kühlung der Vorlage im Vakuum eingeengt und im Faust-Heimschen Trocknungsapparat vollends eingedampft. Dabei verminderte sich die Ausbeute auf 43 Proz. (M.Z.Q. 23,6).

Die in ein Becherglas oder in Zentrifugengläser übergespülte konzentrierte Lösung (40 ccm), die noch würzigen Hefegeruch und braune Farbe besaß, wurde unter Umrühren bei 0° mit dem gleichen Volumen von eiskaltem Aceton gefällt, in einer rasch an- und auslaufenden Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt und mit eiskaltem Aceton wieder in der Zentrifuge gewaschen. Diese Behandlung mit Aceton sollte nicht länger als etwa 5 Minuten dauern. Man brachte die bräunliche, krümmelige Fällung rasch in den Exsiccator und evakuierte mit der Hochvakuumpumpe. Die Bestimmungen des getrockneten Präparates, 2,367 g vom Zeitwert 2,34, ergaben einen weiteren Rückgang der Ausbeute auf 38,6 Proz. (M.Z.Q. 20,3, Anh. Nr. 161).

In einigen Beispielen blieb die Ausbeute von der Gewinnung der Elution an bis zum trocknen Präparat konstant, häufiger traten aber, namentlich beim Fällen mit Aceton, Invertinverluste auf, die besonders bei den besten Präparaten die Ausbeute und den Reinheitsgrad erheblich beeinflußten. Dennoch war die Fällung mit Aceton nicht zu entbehren, bei welcher viel von den Begleitstoffen, beispielsweise $^3/_4$ der Menge des Invertinpräparates und noch mehr, in der Mutterlauge zurückblieb. Eine andere Verarbeitung desselben Hefeauszugs ergab 45 Proz. Ausbeute in der Elution (bezogen auf das In-

Digitized by Google

vertin nach der Kaolinbehandlung) und lieferte ein Präparat vom Zeitwert 2,8 (Anh. Nr. 162). Eine weitere Autolysenflüssigkeit (13,5 Liter nach der Kaolinbehandlung) lieferte bei einer Ausbeute von 42 Proz. in der Elution 1,4 g Invertin vom Zeitwert 2,4. In diesem Falle war beim Eindampfen kein Verlust, aber beim Fällen mit Aceton Rückgang auf 26,7 Proz. vom Invertin des Hefeauszugs eingetreten (Anh. Nr. 163).

2. *Vollständige Adsorption.*

Man kann das Invertin auch quantitativ mit Aluminiumhydroxyd adsorbieren, aber dieses einfachere Verfahren, das wir öfters anwandten, führt nicht ebenso sicher zu den hohen Reinheitsgraden des Enzyms. Wir verarbeiteten z. B. Hefe vom Zeitwert 245 und behandelten 22 Liter Auszug (Zeitwert auf Hefe bezogen 282) unter Acetonzusatz mit Kaolin. In einer Probe des Filtrats ermittelten wir die Menge Adsorbens, bis 1 ccm Mutterlauge in 15 Minuten bei Einwirkung auf Rohrzuckerlösung unter Zusatz von $^1/_2$ ccm 20 prozentiger Mononatriumphosphatlösung keinen reduzierenden Zucker lieferte. Dann wurde aus dem gesamten Filtrat, 24 Liter, in vier Chargen das Invertin mit je 42,5 g Aluminiumhydroxyd vollständig adsorbiert. Das mittels der Zentrifuge abgetrennte und ausgewaschene Adsorbat schlämmten wir in 1 Liter Wasser an und bewirkten mit 4 ccm 10 prozentigem Ammoniak die Elution, welche 39 Proz. vom Invertin des Hefeauszugs enthielt. Beim Eindampfen trat keine Abnahme ein, beim Fällen und Isolieren aber Rückgang auf 36 Proz. Die Ausbeute betrug 5,42 g, der Zeitwert 3,3 (Anh. Nr. 164).

In einem anderen Beispiel lieferten 35 Liter mit Kaolin vorbehandelter Hefeauszug mit einer Ausbeute von 40 Proz. 13,1 g Invertin vom Zeitwert 5,5 (Anh. Nr. 165). In weiteren Fällen wurden Präparate vom Zeitwert 2,9 und 4,4 erhalten (Anh. Nr. 166 und 167).

Digitized by Google

3. Verarbeitung gealterter Autolysenflüssigkeit.

Besonders einfach und günstig gestaltete sich die Verarbeitung von Hefeauszügen, die lange Zeit aufbewahrt wurden. Die Fortdauer proteolytischer Vorgänge scheint zu bewirken, daß der Hefeauszug an Begleitstoffen, die dem Invertin anhaften, namentlich an höheren Proteinen, ärmer wird. Solche gealterte Autolysenflüssigkeit bedarf keiner Vorbehandlung mit Kaolin; in ihr würde auch zuviel Invertin vom Kaolin bei der Anwendung in acetonhaltiger Flüssigkeit adsorbiert.

Wir verarbeiteten Anfang November 1919 einen Ende März dargestellten und von der Hefe abfiltrierten Auszug vom Zeitwert 400 (auf Hefe bezogen). 10 Liter des Extraktes wurden mit 4 Liter Aceton vermischt, wobei ungewöhnlich wenig Eiweißfällung auftrat, und nach dem Filtrieren mit Aluminiumhydroxyd behandelt. Hier genügte ein Drittel der gewöhnlich für ebensoviel Invertin anzuwendenden Menge, nämlich 11,3 g, zum quantitativen Adsorbieren des Invertins. Die ammoniakalische Elution enthielt nach dem Einengen etwa 40 Proz., aber das mit Aceton gefällte und getrocknete Präparat nur noch etwa 25 Proz. vom Invertin des Hefeauszugs. Die Ausbeute betrug 0,426 g, der Zeitwert (nach der teilweisen Zersetzung) **1,0** (Anh. Nr. 168).

Ein anderer, gleichfalls sieben Monate alter Hefeextrakt (Zeitwert 350) lieferte aus 5 Litern mit einer Ausbeute von 57 Proz. 1,24 g Invertin vom Zeitwert 2,5 (Anh. Nr. 169). Von einem ähnlichen, dritten Autolysensaft ergaben 7 Liter mit einer Ausbeute von 30 Proz. 0,95 g Invertin vom Zeitwert 2,8 (Anh. Nr. 170).

III. Adsorption mit Kaolin.

Das Invertin in der ammoniakalischen Elution aus dem Tonerdeabsorbat wird von Kaolin vollständig aufgenommen. Die erforderliche Kaolinmenge ist aber weit geringer, und der Reinheitsgrad des Invertins läßt sich höher steigern, wenn wir zuerst die Elution einengen

Digitized by Google

und mit Aceton fällen. Der Adsorption mit Kaolin wird das Invertin am besten in schwach essigsaurer Lösung unterzogen.

Wir verarbeiteten 3,83 g Invertin vom Zeitwert 4,8 (M.Z.Q. 16,3). Das Präparat wurde mit wenig Wasser angerieben und in 100 ccm gelöst. Die trübe Flüssigkeit gab nach dem Filtrieren auf Zusatz von 2,5 ccm 2 n-Essigsäure, und noch mehr beim Stehen, flockige Niederschläge, die starke Xanthoproteinreaktion zeigten. Nach wiederholtem Filtrieren enthielt die Lösung noch 8 Proz. des angewandten Invertins (M.Z.Q. 13,6). Unter Verdünnen auf 800 ccm bewirkten wir die vollständige Adsorption mit 83 g Kaolin, das mit kochender Salzsäure vorbehandelt war (vgl. Kap. B, Abschn. VI). Das Adsorbat wurde sogleich in der Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt, worin hauptsächlich Hefegummi zurückblieb, und mehrmals mit Wasser gewaschen. Dann suspendierten wir es mit 1 Liter Wasser und fügten unter Schütteln 0,2 n-Sodalösung bis zur eben beginnenden alkalischen Reaktion hinzu, wofür 11 ccm erforderlich waren. Das Natriumcarbonat wird vom Kaolin aufgenommen, das dabei das adsorbierte Enzym freigibt. Die mittels der Zentrifuge vom Kaolin getrennte Lösung war ganz trüb, sie wurde durch Schütteln mit Kieselgur (50—100 g) klar und ohne Verlust filtrierbar. Die Elution enthielt 68 Proz. (M.Z.Q. 9,25) vom angewandten Invertin (der filtrierten Lösung) und ihr Gehalt blieb bei den folgenden Operationen (Eindampfen und Dialyse) konstant, was bei anderen Beispielen nicht der Fall war.

Die mit Essigsäure ganz schwach angesäuerte Elution wurde im Faust-Heimschen Trockenapparat bei 35—40° Windtemperatur auf 300 ccm eingeengt und von dem dabei auftretenden kaolinähnlich aussehenden Niederschlag unter Zusatz von Kieselgur abfiltriert. Dann unterwarfen wir die Lösung einer dreitägigen Dialyse in Fischblasen (M.Z.Q. danach wieder 9,25) und dampften sie im Faust-Heimapparat in einem Schälchen aus böh-

Digitized by Google

mischem Glas zur Trockne ein. Das Invertin (0,383 g, eine spröde, pulverisierbare Masse) wies den Zeitwert **0,86** auf (M.Z.Q. 9,20, Anh. Nr. 171).

Ein zweites Beispiel für die Reinigung mit Kaolin ist die Verarbeitung von 0,92 g (M.Z.Q. 6,59) eines Invertinpräparates, dessen Zeitwert 2,8 betrug. Die mit 0,1 prozentigem Ammoniak bereitete Kaolinelution erfuhr bis zum vollständigen Abdampfen keine Einbuße an enzymatischer Wirksamkeit. Die Ausbeute betrug 64 Proz., das Präparat (0,181 g) hatte den Zeitwert 0,855 (M.Z.Q. 4,22). In der Mutterlauge von der Kaolinbehandlung waren 0,51 g Substanz, hauptsächlich Hefegummi, zurückgeblieben. Die Adsorption war selektiv, aber nicht die Elution (Anh. Nr. 172).

Die Elutionsausbeute war in anderen Fällen weniger günstig. Aus 17,62 g Invertin vom Zeitwert 4,7 (M.Z.Q. 75) stellten wir mit 270 g Kaolin das Adsorbat dar und eluierten es mit 1,8 Liter Wasser unter Zusatz von 80 ccm 0,2 n-Natriumcarbonat. Die mit Kieselgur geklärte, auf Lackmus neutral reagierende Elution (M.Z.Q. 30) enthielt 40 Proz. des Invertins, das beim Einengen und mehrtägigem Stehen auf 31 Proz. (M.Z.Q. 23) zurückging. Von da an war das Invertin beständig, auch bei sehr langem Stehen seiner Lösung. Die Hälfte der Ausbeute wurde 6 Tage lang dialysiert und eingedampft. Wir erhielten daraus 0,41 g trockenes Präparat, für das sich der Zeitwert 0,725 berechnete (Anh. Nr. 173).

Wenn bei einem solchen Präparat ein besonders günstiger Reinheitsgrad erzielt wurde, so ging damit geringere Beständigkeit Hand in Hand. Wir gingen von 4,4 g Invertin vom Zeitwert 2,57 aus (M.Z.Q. 34,2), das beim Auflösen in 2 Liter, Ansäuern mit 20 ccm 2 n-Essigsäure und Filtrieren eine Einbuße von etwa 6 Proz. erlitt (M.Z.Q. 32,0). Die Adsorption mit 73 g Kaolin war quantitativ, die Elution mit 2 Liter Wasser unter Anwendung von 40 ccm 0,2 n-Sodalösung enthielt nach dem Filtrieren, Klären und Einengen auf 300 ccm

Digitized by Google

(M.Z.Q. 15,3) 48 Proz. vom angewandten Invertin (auf die filtrierte Lösung bezogen). In der bei zweitägiger Dialyse erhaltenen Invertinlösung (M.Z.Q. nur noch 11,0), deren Trockenrückstand 0,368 g betrug, besaß das Invertin den Zeitwert 0,67, während man ohne die Zersetzung bei der Dialyse 0,5 erreicht hätte. Ein Teil der Ausbeute, 0,227 g (M.Z.Q. 5,23) wurde wieder gelöst und weitere 9 Tage dialysiert und zwar nun mit sehr geringem Verlust (M.Z.Q. 15,13). Darauf entsprach das Invertin nach der Wirksamkeit der Lösung und ihrem Trockengewicht (0,142 g) dem Zeitwert **0,55**. Bei abermaligem Abdampfen wurde indessen ein Präparat gewonnen, dessen Zeitwert wieder auf 0,85 angestiegen war (M.Z.Q. 3,33, Anh. Nr. 174).

IV. Über Reinheitsmerkmale und Beständigkeit.

Die Beschreibung und Analyse des nach den Adsorptionsmethoden gewonnenen Invertins wird den Gegenstand einer folgenden Abhandlung bilden. Hier sollen nur diejenigen Eigenschaften der Invertinpräparate angeführt werden, die ihren Verunreinigungen zuzuschreiben sind.

Das nur mittels der Tonerdeadsorption gereinigte Invertin vom Zeitwert 5 bis 2 enthält viel Hefegummi, gibt daher beim Erwärmen mit Fehlingscher Lösung einen zähen, sich zusammenballenden Niederschlag und bildet bei 10 Minuten langem Kochen mit 20 prozentiger Salzsäure reduzierenden Zucker. Das gleichartig gewonnene Präparat vom Zeitwert 1,0 war an Hefegummi arm, die weiter durch Adsorption mit Kaolin gereinigten Präparate frei davon.

Ferner gaben fast alle nach dem Tonerdeverfahren dargestellten Präparate noch Eiweißreaktionen, allerdings nur recht schwach, auf geringe Verunreinigung hindeutend, so die Millonsche Reaktion und die Ninhydrinprobe, während die Biuretreaktion fast immer negativ ausfiel. Nach der zweiten Adsorption bleiben die Eiweiß-

Digitized by Google

reaktionen ganz aus. Nur eine Art von Xanthoproteinreaktion kommt nie zum Verschwinden. Die Präparate bleiben beim Erhitzen in 0,3—1 prozentiger Lösung mit Salpetersäure farblos, zeigen aber beim Übersättigen mit Alkali eine rein gelbe, nicht intensive Farbe.

Das Invertin aus Tonerdeadsorbat liefert eine phosphorreiche Asche, es enthält ferner Ammoniumsalze und zeigt beim Erhitzen schwache Pyrrolreaktion. Es gibt Fällungen mit Pikrinsäure, mit Quecksilberchlorid, mit Bleiessig und auch mit Bleizucker. Dagegen wurde das Invertin vom Zeitwert 0,72—0,85 in 0,2 prozentiger Lösung nicht mehr von Quecksilberchlorid und nicht von Uranylacetat gefällt. Mit basischem Bleiacetat gab es noch eine starke Fällung, mit Bleizucker einen schwachen Niederschlag. Als wir von diesem mit Hilfe von Kieselgur abfiltrierten, blieben im Niederschlag 78 Proz. vom Enzym, und das Filtrat gab dann selbst mit basischem Bleiacetat keine Fällung mehr. Auch diese Reaktion scheint also auf Verunreinigung zu beruhen.

Gang der Invertinwirkung beim Trocknen. Die Invertinwirkung zeigt eine noch eingehend zu untersuchende, merkwürdige Abhängigkeit vom Wassergehalt. Der Zeitwert eines Invertinpräparates stieg beim Aufbewahren im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd von 7,2 auf 12,0 an (bezogen auf gleiches Trockengewicht), verbesserte sich beim Stehen an der Luft auf 8,8, erhob sich bei monatelangem Aufbewahren über Phosphorpentoxyd im Vakuum wieder zu 16,3, um an der Luft unter Aufnahme von 6,3 Proz. Wasser wieder zu 8,0 zurückzukehren. Ein anderes Präparat verlor auch im Vakuum über Phosphorpentoxyd an Wirksamkeit, ohne sich aber an der Luft so weitgehend wie das erste zu erholen. Hier bewegte sich der Zeitwert beim Trocknen von 4,4 bis 7,2 und an der Luft unter Aufnahme von 11,3 Proz. Wasser, die bei der Bestimmung berücksichtigt sind, bis 5,9 zurück (Anh. Nr. 175 und 176).

Beständigkeit in Lösungen. Ein Präparat vom Zeitwert 7 blieb beim Aufbewahren in 0,2 prozentiger Lösung

Digitized by Google

ohne Toluol im Meßkolben während drei Wochen konstant, verlor aber in $1^1/_2$ Jahren seine Wirksamkeit gänzlich (Anh. Nr. 177). Weniger beständig schien eine schwach essigsaure Lösung zu sein. Mehrere mit Aluminiumhydroxyd gereinigte Präparate wurden in 0,025 n-Essigsäure geprüft; eines vom Zeitwert 4 verlor in 14 Tagen 28, ein zweites vom Zeitwert 2,4 in 14 Tagen 60, in abermals 14 Tagen weitere 16 Proz., ein drittes vom Zeitwert 3,2 in den ersten 2 Wochen 22, in darauffolgenden 2 Wochen 0 Proz. der Wirkung (Anh. Nr. 178). Die 0,2 prozentige Lösung eines aus Kaolinadsorbat erhaltenen Invertins vom Zeitwert 0,725 behielt im Jenaer Kolben, in einer silbernen Flasche und im gewöhnlichen Meßzylinder während 2—5 Tagen konstante Wirkung (Anh. Nr. 179).

Bei vorsichtigem Eindampfen nach verschiedenen Verfahren beobachteten wir in zahlreichen Versuchen ohne Regelmäßigkeit Abnahme oder Konstanz des Invertins. Im Abschnitt III wurde z. B. ein Präparat vom Zeitwert 0,55 angeführt, das beim Abdampfen von 300 ccm Lösung zur Trockne um 35 Proz. an Wirkung verlor. Dagegen konnte eine andere Darstellung von Invertin aus Kaolinadsorbat (Zeitwert 0,86) von 1 Liter Volumen bis zur Trockne ohne Verlust eingedunstet werden.

Schädigung durch organische Lösungsmittel.[1]) Die Hemmung der Invertinwirkung durch Alkohol haben C. O'Sullivan und F. W. Tompson[2]) und später C. S. Hudson und H. S. Paine[3]) beobachtet, die auch die Schädigung des Enzyms genauer untersuchten. Nach Hudson und Paine bewirkt bei 30° 50 prozentiger Alkohol maximale Schädigung, bei größerer Alkoholkonzentration nimmt die Schädigung ab, Alkohol unter 20 Proz. wirkt nicht zerstörend.

---

[1]) Die Versuche dieses Abschnitts hat Frl. Dr. Tr. Oppenheimer ausgeführt, der wir für ihre freundliche Unterstützung bestens danken.

[2]) Journ. chem. soc. **57**, 834, 927 (1890).

[3]) Journ. Am. chem. soc. **32**, 1350 (1910).

Digitized by Google

Wie Alkohol, so zeigt auch Aceton zugleich hemmende und schädigende Wirkung auf Invertin. Die Hemmung finden wir nicht wesentlich abhängig vom Reinheitsgrad. Dagegen zeigte sich, daß die schädigende Wirkung von Alkohol und Aceton vom Reinheitsgrad des Invertins in hohem Grade abhängt. Die Begleitstoffe in den Hefeauszügen üben auch hier eine schützende Wirkung aus. Das reinere Invertin der aus Tonerdeadsorbat dargestellten Elution unterliegt schon in viel höherem Maße der Zerstörung durch die organischen Solventien.

Diese schädigende Wirkung beobachteten wir auf zwei Weisen. Man kann, wie Hudson und Paine in ihren genauen Messungen, die Abnahme der Wirkung sofort und nach einer gewissen Einwirkungsdauer bestimmen; aus der Differenz ergibt sich die Zerstörung, die neben der Hemmung einhergeht. Dabei wirkt das organische Lösungsmittel jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen schädigend und hemmend, da die Invertinlösung mit einem gewissen Prozentbetrag von Alkohol oder Aceton versetzt und für die Bestimmung durch Rohrzuckerlösung auf einen niedrigeren Gehalt an organischem Lösungsmittel verdünnt wird. Die angewandten Hefeauszüge waren infolge von Behandlung mit Kaolin arm an Eiweißstoffen. Sie wurden durch Zusatz von Alkohol und Aceton auf einen Gehalt von 30 oder 50 Proz. Alkohol und 28 oder 50 Proz. Aceton gebracht. Diese Konzentrationen waren entsprechend der beginnenden und der vollständigen Ausfällung des Invertins gewählt. Von dem bei Zimmertemperatur mit dem Lösungsmittel versetzten Hefeauszug wurde entweder sofort oder nach längerer Einwirkung eine Probe von 20 ccm zu 50 ccm 32 prozentiger Rohrzuckerlösung und 5 ccm Mononatriumphosphat gegeben und auf 100 ccm aufgefüllt. Das in 30- oder 50 prozentiger Lösung schädiged wirkende Solvens übt also die hemmende Wirkung in 6- und 10 prozentiger Lösung aus. Die Genauigkeit

Digitized by Google

der Messungen war geringer als bei der Mehrzahl unserer Bestimmungen in wäßrigen Lösungen.

Wie die Tabelle 26 zeigt, bewirkt Alkohol schon in niedrigerer Konzentration als Aceton eine bedeutende Hemmung. Die Schädigung durch Aceton ist ähnlich wie durch Alkohol, sie ist in der Elution aus Tonerdeadsorbat größer als in Hefeextrakten.

Tabelle 26.

Invertinwirkung bei Gegenwart organischer Lösungsmittel.

	Prozentgehalt in der Invertinlösung	Prozentgehalt in der Bestimmungsflüssigkeit	Dauer der Einwirkung vor der Bestimmung	Nulldrehungszeit	Abnahme der Invertinwirkung Proz.	Zerstörung des Invertins Proz.
Hefeauszug	—	—	—	39	—	—
Mit Alkohol	30	6	0	63	38	—
„ „	30	6	24 Std.	66	41	5
„ „	50	10	0	59	34	—
„ „	50	10	24 Std.	66	41	11
„ Aceton	28	5,6	0	42	7	—
„ „	28	5,6	24 Std.	45	14	7
Elution	—	—	—	75	—	—
Mit Aceton	50	10	0	97	13	—
„ „	50	10	24 Std.	427	83	77

Unabhängig von der hemmenden Wirkung bestimmten wir die Zerstörung durch Alkohol und Aceton nach einem zweiten Verfahren (Tabellen 27 und 28). Teils sofort nach dem Versetzen mit dem Solvens, teils nach einer gewissen Einwirkungszeit wurde im Vakuum bei einer Badtemperatur von höchstens 45° und unter starker Kühlung der Vorlage das organische Lösungsmittel rasch und vollständig abdestilliert und die Invertinlösung im Meßkolben wieder auf ihr ursprüngliches Volumen gebracht. Im Fall des sofortigen Abdestillierens (Einwirkungsdauer „kurz“ in den beiden Tabellen) vergingen 2 Minuten bis zum Beginn, etwa 30 bis zur Beendigung

Digitized by Google

Tabelle 27.

Schädigung des Invertins im Hefeauszug.

Organisches Lösungsmittel	Einwirkungsdauer	Nulldrehungszeit	Verlust an Invertin Proz.
—	—	39	0
Alkohol, 30 prozent. . .	kurz	39	0
„ 50 „ . .	„	39	0
Aceton, 28 „ . .	„	39	0
„ 50 „ . .	„	41	5
—	—	57	0
Alkohol, 30 prozent. . .	kurz	56	0
„ 30 „ . .	24 Std.	61	7
„ 50 „ . .	kurz	59	3
„ 50 „ . .	24 Std.	66	14
„ 50 „ . .	6 Tage	88	35
Aceton, 28 „ . .	kurz	56	0
„ 28 „ . .	24 Std.	62	8
„ 50 „ . .	kurz	59	3
„ 50 „ . .	24 Std.	65	12

Tabelle 28.

Schädigung des Invertins in Elution aus Tonerdeadsorbat.

Organisches Lösungsmittel	Einwirkungsdauer	Nulldrehungszeit	Verlust an Invertin Proz.
—	—	48	0
Alkohol, 30 prozent. . .	kurz	59	18
„ 30 „ . .	24 Std.	181	74
„ 50 „ . .	kurz	94	49
„ 50 „ . .	24 Std.	463	90
Aceton, 28 „ . .	kurz	62	23
„ 28 „ . .	24 Std.	1090	96
„ 50 „ . .	kurz	63	24
„ 50 „ . .	24 Std.	1175	96

der Destillation. In den Tabellen 27 und 28 sind einige Versuche angeführt, welche die viel größere Empfindlichkeit des gereinigten Invertins veranschaulichen.

Digitized by Google

Anhang. Versuchsbelege.

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
1	a) Hefe, frisch, 21,3 prozentig . .	0,5 g	57,5 86	9,42 5,93	167 162	350
	b) Hefe, zerrieben	0,5 g	58	9,33	165	352
2	a) Hefe, frisch, 20,5 prozentig . .	0,5 g	48,5 75	10,02 6,27	156 147	310
	b) Hefe, zerrieben	0,5 g	47 73	9,97 6,63	151 150	314
	c) Dieselbe, nach 2 Tagen . . .	0,5 g	54 75	9,03 6,50	148,5 149,5	308
3	a) Hefe, frisch, 21 prozentig . .	0,5 g	62 91	8,04 4,52	149 148	312
	b) Hefe, zerrieben	0,5 g	49 63,5	9,48 7,67	144 146	310
4	a) Hefe, frisch, 20,8 prozentig . .	0,5 g	48,5 76,5	10,30 6,96	165 162	340
	b) Hefe, zerrieben	0,5 g	49,5 76,5	10,88 7,82	186 178	390
	c) Dieselbe, nach 3 Tagen . . .	0,5 g	75,5 101	7,33 4,86	164 171	355
5	a) Hefe, frisch, 21,1 prozentig . .	0,25 g	152	5,82	284	300
	b) Hefe, trocken	0,3 g	37 58	6,0 2,25	71,5 74,5	490
6	a) Hefe frisch, 20 prozentig . .	0,5 g	96 117,5	4,00 1,37	147 137	285
	b) Hefe, $^1/_2$ Std. zerrieben . . .	0,1 g	46,5 65,5	12,31 10,71	234 243	475
	c) Hefe, $1^1/_2$ Std. zerrieben . . .	0,1 g	67,5 89	8,42 6,23	170 174	342
7	a) Hefe, frisch, 20 prozentig . .	0,5 g	55,5 72,5	6,88 4,52	118 118	236
	b) Hefe, $^1/_2$ Std. zerrieben . . .	0,2 g	43	4,80	72,5	290
	c) Hefe, $2^1/_2$ Std. zerrieben . . .	0,1 g	80	5,05	139	278
	a) Hefe, frisch, 20,1 prozentig . .	0,5 g	54,5 73,5	9,12 6,92	152 154	306

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
8	b) Hefe, $^1/_2$ Std. zerrieben . . .	0,1 g	78 99	7,67 5,98	180 180	360
	c) Hefe, 2 Std. zerrieben . . .	0,1 g	82 228	6,68 −2,28	150 158	308
9	a) Hefe, frisch	0,5 g	s. 7a	—	—	236
	b) Hefe, $^1/_2$ Std. zerrieben . . .	0,2 g	46,5 64	4,58 1,88	76,5 77,5	308
	c) Hefe, $2^1/_2$ Std. zerrieben . . .	0,1 g	129	−0,18	125	250
0	a) Hefe, nicht bestimmt	—	—	—	—	ca. 250
	b) Hefeauszug nach 3 Std. . . .	5 ccm	124 1162	15,9 10,82	2120 4200	8000
1	Hefeauszug nach 45 Std. . . .	5 ccm	960	7,99	2310	6000
2	a) Hefe, nicht bestimmt	—	—	—	—	ca. 250
	b) Hefeauszug nach 8 Std. . . .	5 ccm	306	13,80	2000	14500
	c) nach 36 Std.	5 ccm	306	13,10	1500	12000
	d) Hefeauszug bei 25°	5 ccm	51 242	13,31 4,40	331 360	2500
3	a) Hefe, frisch, siehe 8a . . .	—	—	—	—	306
	b) Hefe, trocken	0,1 g	60 80	13,02 11,25	348 324	660
4	a) Hefe, frisch, nicht bestimmt .	—	—	—	—	ca. 250
	b) Hefeauszug bei 20°	5 ccm	236	14,72	2500	16500
	c) Hefeauszug bei 30°	5 ccm	282	13,20	1800	12000
5	a) Hefe, frisch, nicht bestimmt .	—	—	—	—	ca. 250
	b) Hefeauszug	5 ccm	96	9,2	248	1650
6	a) Hefe, frisch, siehe 1a . . .	—	—	—	—	350
	b) Hefeauszug, 10 g Hefe mit 100 ccm Wasser	5 ccm	69	12,23	342	3500
7	a) Hefe, frisch, nicht bestimmt .	—	—	—	—	ca. 250
	b) Hefeauszug, 10 g Hefe mit 150 ccm Wasser	5 ccm	232	4,0	324	2200
8	Heferückstand, aus 10 g Trockenhefe zu 200 ccm aufgeschlämmt	5 ccm	41 66,5	12,92 10,47	234 238	1200

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
19	a) Hefe, frisch, nicht bestimmt .	—	—	—	—	ca. 250
	a) Hefeauszug	5 ccm	15	13,7	133	ca. 2000
			151	2,22	194	
20	a) Hefe, frisch, 20,2 prozentig . .	0,25 g	72	11,83	328	
			97	10,72	356	
			110	8,75	295	300
			152	5,82	284	
	b) Hefeauszug nach 24 Std., 10 g Trockenhefe m. 150 ccm Wasser	5 ccm	59	11,88	279	1730
			79	10,09	260	
	c) Hefeauszug nach 14 Tagen . .	5 ccm	48	4,83	82	555
21	a) Hefe, frisch, 22 prozentig . .	0,25 g	15	15,5	205	270
			30	13,8	228	
	b) Hefeauszug, 10 g Hefe mit 150 ccm Wasser	5 ccm	40	11,75	183	1200
			150	1,51	180	
22	a) Hefe, frisch, nicht bestimmt .	—	—	—	—	ca. 250
	b) Hefeauszug aus 10 g Trockenhefe mit 150 ccm Wasser nach 24 Std.	5 ccm	30	5,25	52,5	350
	c) Derselbe, nach 7 Tagen . . .	5 ccm	40	1,02	46	306
23	a) Hefe, frisch, nicht bestimmt .	—	—	—	—	ca. 250
	b) Hefeauszug aus 50 g Hefe mit 400 ccm Wasser	5 ccm	6	11,23	25,6	375
24	a) Hefe, nicht bestimmt	—	—	—	—	ca. 2
	b) Hefeauszug, 10 g Hefe mit 150 ccm Wasser	5 ccm	30	4,62	49,5	3
25	a) Hefe, frisch, siehe 21a . . .	—	—	—	—	2
	b) Hefeauszug, 5 g Hefe mit 75 ccm Wasser	5 ccm	40	5,30	70	4
			70	0,02	70	
26	a) Hefe, frisch, siehe 20a . . .	—	—	—	—	30
	b) Hefeauszug, 10 g Hefe mit 150 ccm Wasser nach 24 Std.	5 ccm	61	0,68	67	4
			81	−1,91	61	
	c) Derselbe, nach 8 Tagen . . .	5 ccm	43	2,71	57,5	3
			69	−1,72	53	

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
27	a) Hefe, frisch, siehe 1 a . . .	—	—	—	—	350
	b) Hefeauszug, 10 g Hefe mit 100 ccm Wasser	2,5 ccm	36,5 60	7,68 3,37	84 86	428
28	a) Hefe, frisch, siehe 6 a . . .	—	—	—	—	288
	b) Hefeauszug, 10 g Hefe mit 100 ccm Wasser nach 3 Tagen	2,5 ccm	44,5 62	7,58 4,87	101 105	502
	c) Derselbe, nach 5 Tagen . . .	2,5 ccm	41,5 70	6,31 1,30	81,5 81,2	408
29	a) Hefe, frisch, 20,5 prozentig . .	0,5 g	75,5 103	7,78 4,75	177 172	358
	b) Hefeauszug, 10 g Hefe mit 100 ccm Wasser	2,5 ccm	40,5 78,5	8,38 2,48	102 102	510
30	a) Hefe, frisch, siehe 21 a . . .	—	—	—	—	276
	b) Autolysensaft	2,5 ccm	14 25	4,8 0,0	24 25	355
31	a) Hefe, siehe 20 a	—	—	—	—	300
	b) Hefeauszug	5 ccm	28 36	5,13 2,52	49,8 48	354
32	a) Hefe, 23 prozentig	0,25 g	51 107	10,72 4,53	188 177	212
	b) Hefeauszug	5 ccm	17 27	4,50 0,8	28 29,5	235
33	a) Hefe, 21 prozentig	0,25 g	67 92	12,14 10,22	328 315	340
	b) Hefeauszug	5 ccm	53 74	−1,37 −3,02	41 38,3	298
34	a) Hefe, 21,4 prozentig	0,5 g	66	5,18	114	245
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	60	1,94	74	282
35	a) Hefe, 20,5 prozentig	0,5 g	47	7,90	110	235
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	88	−1,90	65,5	252
36	a) Hefe, 19,4 prozentig	0,4544 g	49 70	9,92 7,22	154 153	297

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
36	b) Hefeauszug	2,5 ccm	56 69	2,13 0,01	70 69	413
37	a) Hefe, 21,3 prozentig	0,5 g	48	9,55	143	305
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	31,5 60,3	6,20 0,38	61,8 62,8	368
38	a) Hefe, 20,9 prozentig	0,5212 g	40	11,47	167	364
	b) Hefeauszug	5 ccm	33,5 44	−2,77 −3,75	24 23,5	280
39	a) Hefe, 21,4 prozentig	0,4459 g	41 56	12,62 11,30	228 230	437
	b) Hefeauszug	5 ccm	29,5 40	0,00 −2,23	29,5 28,4	344
40	a) Hefe, 21,5 prozentig	0,5 g	39 62	10,83 7,83	148 159	327
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	24,2 43	8,32 3,83	61 65	380
41	a) Hefe, 21 prozentig	0,5 g	44 62	13,38 11,90	286 285	603
	b) 50 g Hefe und 50 ccm H_2O .	2,5 ccm	44	2,40	70	410
	c) 50 g Hefe und 500 ccm H_2O .	10 ccm	89	4,80	149	585
42	Hefe, frisch, siehe 20a	—	—	—	—	300
	Versuch bei 20°:					
	a) 21 Stunden	5 ccm	45 95	14,25 11,71	386 433	2800
	b) 4 Tage	5 ccm	46 65	1,62 −1,50	55,7 52,5	390
	c) 6 Tage, siehe 31	—	—	—	—	354
	d) 8 Tage	5 ccm	39 50	1,40 −0,68	45,7 46,3	330
	Versuch bei 36°:					
	a) 21 Stunden	5 ccm	45 65	6,18 2,50	88 86	635
	b) 4 Tage	5 ccm	46	2,08	59	425
	c) 6 Tage	5 ccm	29 38	5,72 3,14	54,5 53,5	390
	d) 8 Tage	5 ccm	41 56	2,30 0,32	53,5 58	390

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
43	a) Hefe, frisch, siehe 21a . . .	—	—	—	—	276
	b) nach 26 1/2 Stunden	5 ccm	33 78	8,48 1,26	83,5 90,5	770
	c) nach 4 Tagen	5 ccm	32 50	2,61 −1,40	42,7 41	350
44	a) Hefe, siehe 21a	—	—	—	—	276
	b) nach 26 1/2 Stunden	5 ccm	33 126	15,25 9,95	384 391	3320
45	a) Hefe, siehe 20a	—	—	—	—	300
	b) nach 24 Stunden	5 ccm	45 62	14,66 14,25	440 550	3400
46	a—d sind 4 Parallelversuche aus derselben Hefe bei 20° und 0° mit und ohne Phosphat.					
	Bestimmung der Hefe, 20,9 proz..	0,5888 g	59 71 85	8,13 6,11 4,72	145 145 143	355
	a) ohne Phosphat 0°	5 ccm	60,5 84,5	11,45 9,73	248 255	1870
	b) ohne Phosphat 20°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	61,5 88,7	6,40 3,50	120 128	920
	2. 48 Stunden	5 ccm	55 69	1,02 −1,15	62 59,5	450
	3. 72 Stunden	5 ccm	30	1,0	33,8	252
	c) mit Phosphat 0°:					
	24 Stunden	5 ccm	60,5 85,5	11,40 9,30	248 252	1870
	d) mit Phosphat 20°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	62,2 89	1,85 −1,30	75,3 74	560
	2. 48 Stunden	5 ccm	41,5 58	2,82 −0,48	53,5 52,5	395
	3. 72 Stunden	5 ccm	34	4,20	53	395
47	a—d wieder Parallelversuch.					
	Hefe, 21,4 prozentig	0,5743 g	75 87	5,15 4,02	132 135	328

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
47	a) ohne Phosphat 0°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	34	14,24	275	2190
			60	12,20	296	
	2. 48 Stunden	5 ccm	41	10,92	154	1165
			68,5	7,15	150	
	b) ohne Phosphat 20°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	36,5	10,10	119	913
	2. 48 Stunden	5 ccm	35	5,72	64,6	493
			62	0,38	64	
	c) mit Phosphat 0°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	35	14,09	275	2075
			60	11,78	267	
	2. 48 Stunden	5 ccm	35	12,92	199	1210
			62,5	8,40	158	
	d) mit Phosphat 20°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	36	8,50	92,3	713
			60,5	4,10	94	
	2. 48 Stunden	2,5 ccm	54	7,36	118	458
			78	4,13	121	
48	Frische Hefe, 20,5 prozentig . .	0,6458 g	70,5	5,48	123	318
			88	3,08	127,5	
	a) ohne Phosphat 0°	5 ccm	32,5	14,60	300	2240
			54,5	13,23	338	
	b) ohne Phosphat 25°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	30,5	6,01	58	400
			54	0,35	56	
	2. 72 Stunden	5 ccm	44	1,40	51,5	358
			55	−0,72	50,0	
	c) mit Phosphat 0°	5 ccm	36	14,71	342	2450
			57,5	13,20	356	
	d) mit Phosphat 20°:					
	1. 24 Stunden	5 ccm	25,5	6,34	50	390
			51,5	0,88	57,5	
	2. 72 Stunden	5 ccm	47,5	−0,10	45,7	322
49	Frische Hefe, 22,4 prozentig . .	0,6139 g	95,5	1,03	107	295

Digitized by Google

Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
a) 4 Stunden	5 ccm	86 109	15,85 15,62	1205 1455	10550
b) 22 Stunden	5 ccm	75,5 117	−1,23 −4,00	62,7 57,5	495
c) 48 Stunden	5 ccm	40,7	−1,9	30,1	244
a) Hefe, frisch, siehe 47	—	—	—	—	328
b) 48 Stunden	5 ccm	27,7 55	2,88 −2,88	38,9 36,9	291
c) 72 Stunden	5 ccm	39	−0,23	37,7	292
a) Hefe, frisch, 20 prozentig	0,501 g	44,5 78	10,78 5,82	170 147	315
b) Hefeauszug	2,5 ccm	27,5 51,5	4,60 0,11	48 52	300
a) Hefe, frisch, siehe 6a	—	—	—	—	288
b) Hefeauszug	2,5 ccm	58,5	0,08	59	357
a) Hefe, frisch, 21,2 prozentig	0,5 g	55,5	6,88	118	250
b) Hefeauszug	2,5 ccm	40	−1,47	32,4	191
a) Hefe, frisch, siehe 3a	—	—	—	—	312
b) Hefeauszug	5 ccm	16,7	−1,55	13,2	153
a) Hefe, frisch, 21,3 prozentig	0,4533 g	49 70	9,91 7,23	154 153	297
b) NH_3, Toluol	2,5 ccm	50 63,5	3,33 1,12	72 72,5	270
c) Hudson, siehe 36b	—	—	—	—	418
Hefe, nicht bestimmt	—	—	—	—	ca. 240
a) NH_3, Toluol	5 ccm	25	−0,70	20	240
b) Hudson	5 ccm	28	−2,0	21	240
Hefe, siehe 37a	—	—	—	—	305
a) NH_3, Toluol	2,5 ccm	32 61,2	9,99 4,82	105 105	390
b) Hudson, siehe 37b	—	—	—	—	369
Hefe, frisch, 20,9 prozentig	0,5211 g	40	11,47	167	363
a) NH_3, Toluol	5 ccm	44	−2,78	29,7	223
b) Hudson, siehe 38b	—	—	—	—	280

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
59	Hefe, siehe 34 a	—	—	—	—	245
	a) NH_3, Toluol	2,5 ccm	34,5	2,40	44,5	268
	b) Hudson, siehe 34 b	—	—	—	—	282
60	a) Hefe, siehe 6 a	—	—	—	—	280
	b) nach Stehen	0,5 g	47 60,5	10,19 8,48	155 153	295
61	a) Hefe, frisch, siehe 41 a . .	—	—	—	—	603
	b) nach $^3/_4$ Stunde	0,5 g	47 64	12,98 11,58	271 267	568
	c) nach 24 Stunden	0,5 g	74 93	10,40 8,77	253 244	535
62	a) Hefe, frisch, siehe 34 a . . .	—	—	—	—	245
	b) Toluol	0,5 g	63,5	3,30	91	195
	c) Essigester-Toluol	0,5 g	58,5	4,10	92	194
63	a) Hefe, frisch, 21,5 prozentig . .	0,5 g	52,5	7,51	120	258
	b) Hefeauszug, sofort	5 ccm	51 102	12,32 7,50	257 242	1950
	c) Hefeauszug m. Essigester 4 Tage	2,5 ccm	33 46,5	14,81 14,00	315 360	1350
	d) Hefeauszug mit Toluol 4 Tage	2,5 ccm	29,5 41	8,23 5,32	73 72,5	280
64	a) Hefe, frisch, 21,7 prozentig . .	0,5 g	54,5 73,5	9,12 6,90	152 154	330
	b) $^1/_2$ Std. zerr. 50 g Hefe m. 100 g H_2O	5 ccm	124	2,80	167	1280
	c) 1 Std. zerr. 50 g Hefe m. 500 g H_2O	5 ccm	127,5 311	11,57 4,78	532 527	1080
65	a) Hefe, frisch, 20 prozentig . .	0,5 g	64,5 87	9,38 6,39	181 173	350
	b) 50 g Hefe mit 200 g H_2O . .	5 ccm	128 158	2,25 0,80	163 172	690
	c) Hefeauszug mit Toluol 4 Tage	2,5 ccm	77,5 111	1,82 −1,41	94 90	340
	d) Hefeauszug, 4 Tage m. Essigester	2,5 ccm	65 85,5	10,08 9,01	210 231	780

Die rückständige Hefe von 50 g Preßhefe wog 90 g (mit Seesand). Al
entsprechen 0,5 g 0,22 g Preßhefe.

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
65	α) Heferückstand	0,5 g	44 62	15,37 14,60	535 570	500
	β) Hefeauszug mit 100 ccm H_2O .	2,5 ccm	47,5 73,5	16,57 15,93	1240 1300	6000
	Dabei ist zu beachten, daß dieser Hefe noch etwa 30 ccm Extrakt von d) anhaftete, so daß höchstens $^1/_{10}$ des in β) bestimmten Invertins aus dem Heferückstand neu ausgezogen wurde.					
66	a) Hefe, frisch, 21,6 prozentig . .	0,5 g	114 178	1,43 −2,21	135 129	285
	b) $^3/_4$ Std. zerrieben 25 g Hefe mit 250 ccm H_2O	5 ccm	45 117	11,50 4,05	188 190	375
	c) $2^1/_2$ Std. zerrieben 25 g Hefe mit 250 ccm H_2O	5 ccm	39 111	12,10 4,10	186 183	365
	d) Hefeauszug, 4 Tage mit Essigester	2,5 ccm	40 55	12,01 9,08	181 181	403
67	a) Hefe, frisch, siehe 41a . . .	—	—	—	—	603
	b) 10 g Hefe zerrieben mit 100 ccm H_2O	5 ccm	78 95,5	10,34 8,80	264 258	505
68	a) Hefe, frisch, siehe 6a . . .	—	—	—	—	288
	b) 10 g Hefe mit 100 g H_2O . .	5 ccm	55 106,5	7,90 0,72	129 120	900
69	Hefe, frisch, siehe 7a	—	—	—	—	236
	a) $1^1/_2$ Std. zerrieben 10 g Hefe mit 250 g H_2O	5 ccm	128 158	−1,38 −2,88	105 105	420
	b) $2^1/_2$ Std. zerrieben, 10 g Hefe mit 500 g H_2O	5 ccm	40,5 52,5	11,57 10,11	165 166	332
70	a) Hefe, frisch, siehe 8a . . .	—	—	—	—	306
	b) 5 g Hefe mit 150 ccm H_2O .	2,5 ccm	48 114,5	11,52 5,48	200 207	337
71	a) Hefe, frisch, siehe 7a und 9 .	—	—	—	—	236
	b) 5 g Hefe mit 150 ccm H_2O .	5 ccm	68,5	2,99	97	305

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minuten-
72	Hefe, nicht bestimmt, siehe 56 .	—	—	—	—	ca.
	a) 3 Tage	5 ccm	31 64	7,42 0,79	75 69,5	
	b) 5 Tage	5 ccm	30,5 53	4,82 0,26	53,5 54,5	
	c) Heferückstand: Unter der Annahme, daß 50 Proz. der Trockensubstanz der Hefe vorher extrahiert waren, wurde mit der rückständigen Hefe, die nunmehr 35,6 Proz. Trockenrückstand hatte, eine Bestimmung gemacht. Die 0,5 g entsprachen also ungefähr 1,75 g der ursprünglichen Hefe	0,5 g	42,5 82,5	11,62 7,99	183 200	ca.
73	Hefe, frisch, siehe 37a	—	—	—	—	
	a) Hefeauszug	5 ccm	32 55	16,52 15,83	775 789	
	b) Die abfiltrierte Hefe v. ursprünglich 50 g Preßhefe mit ca. 200 ccm Wasser 3 Tage ausgezogen . .	5 ccm	49 63,5	16,92 16,61	2200 1700	ca.
74	Hefe, frisch, siehe 58	—	—	—	—	
	a) sauer	5 ccm	33,5 50	6,71 3,33	69,8 71	
	b) neutral	5 ccm	36,5	4,45	58,7	
	c) NH_3: 1. 3 Tage	5 ccm	51,5	−2,25	86,8	
	2. 5 Tage	5 ccm	47,5	−0,77	42,7	
75	a) Hefe, frisch, 19 prozentig . .	0,4711 g	45 57	11,91 10,68	207 206	
	b) Essigester $CaCO_3$	5 ccm	26 47	5,32 0,0	46,2 47	
76	Hefe, frisch, 20,7 prozentig . . .	0,4722 g	37,5 54,5	12,78 10,65	203 194	
	a) MgO: 1. 3 Tage	5 ccm	38,5	14,12	320	
	2. 5 Tage	5 ccm	78	10,00	248	
	b) NH_3: 1. 3 Tage	5 ccm	67,5	9,62	214	
	2. 5 Tage	5 ccm	37	9,52	105	
77	Hefe, frisch, 21,4 prozentig . . .	0,4840 g	55 70	10,67 9,15	199 195	
	a) $KHCO_3$: 1. 3 Tage	5 ccm	36,5 58,5	10,70 7,48	135 130	
	2. 5 Tage	5 ccm	94	3,82	141	

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
77	b) CO_2: 1. 3 Tage	5 ccm	32,2 54,5	9,41 5,22	93,5 95,5	1150
	2. 5 Tage	5 ccm	94	0,66	96	1180
	c) NH_3: 1. 3 Tage	5 ccm	28,5 52	14,23 11,95	238 239	2800
	2. 5 Tage	5 ccm	41,5 56,5	12,62 11,21	224 228	2560
	d) Heferückstand von c 2. Eine Extraktbestimmung ergab, daß 32,2 Proz. der Trockensubstanz der Hefe extrahiert waren, die abfiltrierte und abgepreßte Hefe hatte einen Trockenrückstand von 45 Proz. Mithin entsprechen den angewandten 0,534 g extrahierter Hefe 1,77 g ursprüngliche Preßhefe	0,534 g	39,5	0,50	42,2	330
78	a) Hefe, frisch, siehe 1a . . .	—	—	—	—	350
	b) Hefeauszug	5 ccm	51,5 65	1,38 −0,13	59,8 63	720
	c) Der Rückstand von 300 g extrahierter Preßhefe wurde z. 300 ccm aufgeschlämmt u. bestimmt mit	2,5 ccm	43 56	12,02 10,87	198 208	1600
	d) 2 Tage ausgezogen	5 ccm	50 74,5	11,60 8,85	222 200	3300
79	a) Hefe, frisch, siehe 40a . . .	—	—	—	—	327
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	31 48	10,13 7,06	102 103	650
80	Hefe, frisch, siehe 41a	—	—	—	—	603
	a) wenig Wasser	5 ccm	56	14,40	500	6000
	b) 10 faches Wasser	10 ccm	92	15,70	1300	5000
81	a) Hefe, frisch, 21,5 prozentig . .	0,5 g	114 178	1,43 −2,21	135 129	285
	b) Hefeauszug	2,5 ccm	44,5 65,5	17,24 16,88	2400 2500	5700
	c) Heferückstand: Die abfiltrierte Hefe von der Extraktion von 25 g Preßhefe wog 10 g; davon 0,25 g zur Bestimmung, also = 0,625 g ursprüngliche Preßhefe	0,25 g	55 121	8,87 1,59	147 144	385
	d) Mit 30 ccm H_2O ausgezogen .	2,5 ccm	54 420	16,75 14,51	1600 3800	30000

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenzahl
82	Hefe, frisch, siehe 34a	—	—	—	—	
	a) wenig Wasser	5 ccm	60	11,17	243	
	b) 10 faches Wasser	10 ccm	50	16,04	830	
	c) Heferückstand von a. Die abfiltrierte Hefe von 50 g Preßhefe wog 27,8 g. Davon 0,4125 g zur Bestimmung = 0,75 g ursprünglicher Preßhefe	0,4125 g	66	4,12	103	
	d) Mit 100 ccm H_2O ausgezogen	5 ccm	60	15,75	877	
	e) Heferückstand von b). Die rückständige Hefe von 50 g Preßhefe trug 24,311 g, also entsprachen die 0,446 g der Bestimmung 0,91 g ursprünglicher Preßhefe . . .	0,446 g	62,5	2,50	82	
	f) Mit 100 ccm H_2O ausgezogen .	5 ccm	52	16,2	1140	
83	Hefe, frisch, siehe 51a	—	—	—	—	
	a) Essigester–Toluol	2,5 ccm	29,5 52,5	3,08 0,00	41,5 52,5	
	b) Toluol, siehe 51b	—	—	—	—	
84	Hefe, frisch, siehe 3a	—	—	—	—	
	a) Essigester–Toluol	5 ccm	13,2 21	−0,61 −2,23	12,2 15,2	
	b) Toluol, siehe 54b	—	—	—	—	
85	Hefe, frisch, 20,8 prozentig . . .	0,5 g	59 74,5	8,18 6,57	143 153	
	a) Auszug mit $(NH_4)_2HPO_4$ . .	5 ccm	19,7 33,2	−1,70 −3,80	15,5 16,5	
	b) Auszug mit Na_2HPO_4 . . .	5 ccm	12 24,5	2,25 −0,75	15,4 22	
86	a) Hefe, frisch, siehe 77 . . .	—	—	—	—	
	b) Essigester–Toluol	5 ccm	23,5	1,62	27,7	
87	a) Hefe, frisch, siehe 1a . . .	—	—	—	—	
	b) 300 g Hefe mit 300 g H_2O und 7 g $CaCO_3$	2,5 ccm	40 53	7,38 5,32	89 93	
	Hefe, frisch, siehe 38	—	—	—	—	
	a) Toluol: 1. 3 Tage, siehe 38b	—	—	—	—	
	2. 5 Tage	5 ccm	43,5 58	−2,9 −3,2	28,3 35,7	

Digitized by Google

Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Minutenwert
b) Chloroform: 1. 3 Tage . . .	5 ccm	43 50,5	0,72 −0,38	46,6 48	545
2. 5 Tage . . .	5 ccm	86 55,5	2,70 0,70	48,8 50,3	558
a) Hefe, frisch, siehe 40a . . .	—	—	—	—	327
b) Chloroform	2,5 ccm	31,8 49,3	12,92 10,58	185 177	1090
c) Toluol, siehe 40b	—	—	—	—	380
a) Hefe, frisch, siehe 75a . . .	—	—	—	—	417
b) Chloroform und $CaCO_3$ . . .	5 ccm	27,5 47	6,51 3,84	54,7 59,5	650
c) Toluol und $CaCO_3$	5 ccm	20	2,08	25	300
Hefe, nicht bestimmt	—	—	—	—	ca. 360
a) ohne Phosphat	5 ccm	25 40	11,0 8,58	95 103	1200
b) mit Phosphat.	2,5 ccm	42,5 64,5	7,02 3,53	90 94	515
Hefe, nicht bestimmt	—	—	—	—	ca. 360
a) ohne Phosphat	5 ccm	30 41	10,25 8,65	100 101	1200
b) mit Phosphat.	2,5 ccm	25,2 50,5	9,30 3,86	71,5 77,5	462
Hefe, frisch, siehe 6a.	—	—	—	—	288
a) Chloroform PO_4.	2,5 ccm	66,5	−1,73	50,7	293
b) Toluol PO_4 siehe 52b . . .	—	—	—	—	357
Hefe, frisch, siehe 53a	—	—	—	—	250
a) Chloroform PO_4.	2,5 ccm	39,5	0,98	44,3	260
b) Toluol PO_4 siehe 53b . . .	—	—	—	—	191
Hefe, frisch, siehe 3a	—	—	—	—	312
a) Chloroform PO_4.	2,5 ccm	20,2	−1,7	15,6	189
b) Toluol PO_4 siehe 54b . . .	—	—	—	—	153
a) Hefeauszug	5 ccm	47	−1,24	39,8	—
b) derselbe nach Kaolinbehandlung	5 ccm	46	−0,91	40,6	—

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 dm-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
96B	Die beiden Bestimmungen sind aus praktischen Rücksichten auf den Wert 53 umgerechnet, was einer Verdünnung des Ausgangsextraktes von 40 Proz. entspricht.					
	a) Hefeauszug, siehe 33 b . . .	—	—	—	—	—
	b) 25 ccm Auszug mit 24 ccm Wasser verdünnt und mit Kaolin behandelt	5 ccm	83	−0,71	77,5	—
97	a) Hefeauszug	2,5 ccm	80,5	0,75	87,5	—
	b) nach Kaolinbehandlung . . .	2,5 ccm	85,5	−0,50	80	—
98	a) 1 Liter Hefeauszug	2,5 ccm	28,5 46,5	7,22 3,02	63,5 65	6,20
	b) derselbe mit 400 ccm Aceton verdünnt und mit Kaolin behandelt	2,5 ccm	73,5	3,07	103	5,45
	c) derselbe in einer 2. Probe . .	2,5 ccm	58,5	5,80	110	5,10
	d) derselbe in einer 3. Probe . .	2,5 ccm	48	7,30	107	5,23
99	a) 1 Liter Hefeauszug	2,5 ccm	31	3,75	46	8,70
	b) derselbe mit 400 ccm Aceton verdünnt und mit Kaolin behandelt	2,5 ccm	35,3	8,05	86	6,50
	c) derselbe mit einer 2. Probe. .	2,5 ccm	62,5	1,58	75	7,47
100	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	53	−1,60	41	0,499
	b) derselbe mit 40 ccm Aceton, 100 ccm Wasser u. 15 g Kaolin	5 ccm	80	2,35	105	0,455
101	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	23,5	4,37	38	0,525
	b) derselbe mit 40 ccm Aceton und 10 g Kaolin versetzt	1,25 ccm	60	11,56	242	0,462
102	a) 1 Liter Hefeauszug.	2,5 ccm	54,5	3,81	82,5	4,85
	b) derselbe mit 400 ccm Aceton und 100 g Kaolin versetzt . .	2,5 ccm	60,5	9,45	183	3,06
103	a) 300 ccm Extrakt.	2,5 ccm	91	6,60	184	0,65
	b) das nach der Behandlung mit dem Extrakt abfiltrierte Kaolin zu 200 ccm suspendiert . . .	2,5 ccm	144	9,28	408	0,22
104	a) sofort	1,25 ccm	78	10,55	278	—

Digitized by Google

r.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
14	b) nach 48 Stunden	1,25 ccm	140	6,50	278	—
	c) nach 3 Tagen.	1,25 ccm	123,5	7,00	262	—
	d) nach 7 Tagen.	2,5 ccm	145	0,18	149	—
15	a) sofort	1,25 ccm	78,5	14,32	654	—
	b) nach 3 Tagen	1,25 ccm	140,3	12,19	690	—
	c) nach 7 Tagen	2,5 ccm	158 231,5	7,0 3,55	330 345	—
16	a) sofort	1,25 ccm	77	10,80	285	—
	b) nach 48 Stunden	1,25 ccm	148	7,02	301	—
	c) nach 3 Tagen.	1,25 ccm	123	8,22	310	—
	d) nach 7 Tagen.	2,5 ccm	152,5 226,5	1,40 −2,15	177 162	—
17	a) sofort	1,25 ccm	82	12,75	476	—
	b) nach 48 Stunden	1,25 ccm	147	9,20	415	—
	c) nach 3 Tagen.	1,25 ccm	122	9,90	384	—
	d) nach 7 Tagen.	2,5 ccm	149 223	4,35 0,90	236 246	—
18	a) sofort	2,5 ccm	101	9,04	280	—
	b) nach 48 Stunden	2,5 ccm	79,5	9,56	236	—
	c) nach 72 Stunden	1,25 ccm	135	11,04	522	—
	d) nach 7 Tagen	1,25 ccm	120	11,1	458	—
	e) nach 7 Tagen und 4 Stunden .	1,25 ccm	149 201,5	10,50 8,41	533 506	—
	f) nach 8 Tagen.	2,5 ccm	151 226	5,25 1,25	265 258	—
19	a) sofort	5 ccm	69	3,48	100	—
	b) nach 48 Stunden	5 ccm	47,5 81,7	6,09 1,20	91,5 93,5	—
20	a) 1 Liter Hefeauszug.	2,5 ccm	34,5	2,40	44,5	9,00
	b) derselbe mit 400 ccm Aceton .	1,25 ccm	36 266,5	16,40 12,60	800 1230	1,11
21	Hefeauszug, siehe 110a	—	—	—	—	9,00

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
111	a) 1400 ccm acetonhaltiger Hefeauszug sofort	1,25 ccm	61 226,5	12,45 2,40	307 292	3,73
	b) nach 24 Stunden	1,25 ccm	308,5	13,25	1870	0,6
112	a) 1 Liter Hefeauszug siehe 35 b .	—	—	—	—	6,17
	b) 1400 ccm acetonhaltig . . .	2,5 ccm	84,5	14,30	710	0,79
113	a) 1 Liter Hefeauszug.	2,5 ccm	34	2,18	43	9,10
	b) 1400 ccm acetonhaltig . . .	2,5 ccm	86,5	−2,1	62	9,10
114	a) 200 ccm acetonhaltiger Hefeauszug	5 ccm	30,5	5,38	55	0,715
	b) 250 ccm Adsorbat gewaschen .	5 ccm	31 50,5	7,61 2,84	72 68	0,714
	c) dasselbe nach 24 Stunden . .	5 ccm	69,5 92	1,10 −1,57	79,3 72	0,657
	d) das Adsorbat aus 75 ccm acetonhaltigem Hefeauszug wurde nach 24 Stunden zu 100 ccm aufgeschlämmt:					
	75 ccm Acetonextrakt. . .	—	—	—	—	0,265
	100 ccm Adsorbat	5 ccm	67 89	1,63 −0,63	80,5 81,3	0,247
115	1. ohne Aceton 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	38,5	4,51	62,5	0,321
	a) 200 ccm Adsorbat sofort. . .	5 ccm	56 84	7,11 3,28	120,5 119,5	0,323
	b) 200 ccm Adsorbat nach 24 Stdn., im Extrakt gestanden	5 ccm	78 95	5,62 3,51	143 147	0,255
	c) Adsorbat a, gewaschen nach 24 Stunden.	5 ccm	75,5 91,5	5,09 3,13	127,5 128,5	0,30
	2. mit Aceton 100 ccm Extrakt .	—	—	—	—	0,321
	a) 176 ccm Adsorbat sofort. . .	5 ccm	55,5 79,5	6,31 3,00	109 109	0,323
	b) 176 ccm Adsorbat nach 24 Stdn., im Extrakt gestanden	5 ccm	67 89,5	6,78 3,40	138 130	0,252

Digitized by Google

r.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
5	c) Adsorbat a, gewaschen nach 24 Stunden	5 ccm	70,5 92,5	5,08 2,19	121 117	0,297
6	a) 100 ccm Hefeauszug	2,5 ccm	39 61	6,98 2,81	90 84,5	0,465
	b) 150 ccm Adsorbat ohne Aceton	5 ccm	36,5 57,5	5,02 0,67	65 62,5	0,470
	c) Mit Aceton, siehe 119b, auf 100 ccm Extrakt umgerechnet	.	—	—	—	0,335
7	a) 600 ccm Adsorbat	5 ccm	47 62	5,46 2,31	83,5 82,5	1,45
	b) Dasselbe nach 5 Tagen . . .	5 ccm	63,5 84,5	4,47 0,63	102 90,5	1,265
	c) Dasselbe nach 18 Tagen . .	5 ccm	57 115	10,59 1,70	150 141	0,825
3	a) 350 ccm Adsorbat	5 ccm	38 55	5,68 1,88	70,2 68,5	1,01
	b) Dasselbe nach 4 Std.	5 ccm	47 70,5	6,52 2,21	96 91	0,75
	c) Dasselbe nach 2 Tagen . . .	5 ccm	36 63,5	9,90 5,08	113 108	0,687
9	a) 843 ccm Hefeauszug siehe 116a	—	—	—	—	3,92
	b) 400 ccm Adsorbat	2,5 ccm	19,5 33	8,94 4,58	57 57	2,81
	c) Dasselbe nach 24 Stunden . .	2,5 ccm	33,7 60	6,52 1,19	72,5 69	2,27
)	a) 600 ccm Adsorbat, siehe 117a	—	—	—	—	1,45
	b) Dasselbe, nach Eluieren zu 450 ccm aufgeschlämmt . . .	5 ccm	45 58	12,53 11,20	237 250	0,373
	c) Dasselbe nach 5 Tagen . . .	5 ccm	80 111	10,17 7,04	234 238	0,384
1	a) 1 Liter Hefeauszug	1,25 ccm	74	8,60	190	4,22
	b) Adsorption aus 100 ccm s. 124					
	c) 400 ccm acetonhalt. Hefeauszug nach Zufügen von 10% Tonerde	1,25 ccm	62,5 229	13,87 5,87	460 430	2,45

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge–Zeit-Quotient
122	1400 ccm acetonhaltiger Auszug nach Zufügen von 20 % Tonerde (äquivalente Menge auf 1 Liter Hefeauszug bezogen)	1,25 ccm	55,5 136,5	14,69 11,30	530 555	1,5
123	Alle Lösungen gleiches Volumen, Hefeauszug ohne Zusatz, siehe 108.					
	100 ccm Hefeauszug	2,5 ccm	—	—	280–226	0,1
	a) Mit 4,5 Proz. Tonerde . . .	2,5 „	95	9,60	282	0,1
	b) Mit 9 „ „ . . .	2,5 „	94	10,56	340	0,1
	c) Mit 18 „ „ . . .	2,5 „	92,6	12,00	440	0,2
	d) Mit 32 „ „ . . .	2,5 „	92	15,15	945	0,9
124	Ebenfalls durch Zufügen von Wasser auf gleiches Volumen in jeder Pr gebracht und auf 100 ccm Hefeauszug (verdünnt mit Wasser und Ac berechnet.					
	a) 100 ccm Hefeauszug	2,5 ccm	66 96	9,92 6,57	210 195	0,3
	b) Mit 16 Proz. Tonerde . . .	2,5 „	48,5	11,40	202	0,1
	c) Mit 50 „ „	2,5 „	76,5 323,5	14,84 7,03	730 695	0,3
	d) Mit 66 „ „	2,5 „	77,5 324,5	16,00 12,60	1290 1760	0,5
	e) Mit 83 „ „	2,5 „	79 326	16,88 15,80	3520 4825	0,7
125	100 ccm Adsorbat	5 „	52 68	0,36 −1,48	54,3 51,0	0,2
	a) 100 ccm NH_3-Elution . . .	5 „	41,5	10,03	132	0,1
	b) 100 ccm Na_2HPO_4-Elution . .	5 „	35,5 51	5,95 2,51	66,7 66,7	0,3
	c) 100 ccm $(NH_4)_2HPO_4$-Elution .	5 „	35 58,5	6,22 1,23	68,5 67	0,2
	100 ccm Adsorbat	5 „	33,5 42,5	0,61 −1,63	36 33	0,1
	97 ccm Oxalatelution	5 „	35,5 57	8,87 4,62	95 95	0,2
	Ein normales, nicht bestimmtes Adsorbat wurde in gleichen Teilen Ammoniak und Soda eluiert und die Filtrate bestimmt. Die N drehungswerte sind also direkt vergleichbar.					
	a) NH_3-Elution	1,25 ccm	86,5	−0,21	82,5	–
	b) Soda-Elution	1,25 „	84,5	9,82	240	–

Digitized by Google

	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
6	100 ccm Adsorbat	5 ccm	61 69	0,48 −0,38	65,7 65,8	0,304
	a) 92 ccm NH_3-Elution	5 ccm	45 74,5	9,92 6,18	141 144	0,13
	b) 93 ccm 0,005 proz. $NH_4CO_2CH_3$-Elution	5 ccm	45,5 73,5	10,69 7,16	164 161	0,116
	c) 103 ccm 0,05 proz. $NH_4CO_2CH_3$-Elution	5 ccm	44,5	13,47	283	0,072
	d) 0,2 proz. $NH_4CO_2CH_3$ nach 1 Std. noch keine merkliche Reaktion.					
	e) 92 ccm 0,005 proz. Asparagin-Elution	5 ccm	45,5 73,5	10,59 7,01	160 146	0,118
	f) 93 ccm 0,05 proz. Asparagin-Elution	5 ccm	70,5 94	8,17 5,85	173 174	0,111
	g) 126 ccm 0,5 proz. Asparagin-Elution	5 ccm	77 99	14,36 13,52	642 660	0,039
7	100 ccm Adsorbat	5 ccm	74	0,26	66,7	0,298
	a) 93 ccm NH_3-Elution	5 ccm	62 79	6,13 3,58	122 116	0,161
	b) 93 ccm 0,005 proz. $CaCl_2$ . .	5 ccm	61 79	7,14 5,61	138 144	0,133
	c) 93 ccm 0,05 proz. $CaCl_2$ . . .	5 ccm	65,5 85,5	16,51 16,03	1650 1480	0,014
	d) 1 Proz. $CaCl_2$ nach viertelstünd. Einwirkung noch keine Reduktion von Fehlingscher Lösung.					
3	80 ccm Adsorbat	5 ccm	60,5 103	5,67 0,45	111,5 108,8	0,145
	1. 72 ccm NH_3-Elution	5 ccm	56,5 72	11,28 9,66	209 218	0,068
	2. Ohne NH_3 nach viertelstündig. Einwirkung auf Rohrzucker noch kein reduzierender Zucker nachweisbar.					
	3. 82 ccm 0,05 proz. NaH_2PO_4 .	5 ccm	51 66,5	10,86 9,08	190 184	0,087
	4. 73 ccm 0,005 proz. NaH_2PO_4 .	5 ccm	55,5 68	10,27 9,10	185 189	0,078

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
128	5. 51,1 ccm 0,05 proz. NH_3 und 0,05 proz. NaH_2PO_4	5 ccm	44 76	6,77 1,08	91,8 86,6	0,115
	6. 51,5 ccm 2 proz. Phosphat	5 ccm	62,5 75	3,88 1,56	93,7 89	0,114
	7. 63 ccm 1 proz. NH_3 u. 0,5 proz. Phosphat	5 ccm	78 103	9,61 6,88	231 215	0,056
129	a) 200 ccm mit Bleiacetat beh. Hefeauszug	2,5 ccm	60	8,15	146	0,547
	b) 105 ccm NH_3-Elution	2,5 ccm	75,5	17,25	ca. 5000	ca. 0,00
	c) 200 ccm eluiertes Adsorbat	2,5 ccm	77	9,85	240	0,333
	d) 105 ccm Phosphatelution	2,5 ccm	70,5	3,80	120	0,36
130	a) 100 ccm Bleiacetat gereinigter Hefeauszug	5 ccm	47,5 78,5	3,67 −1,65	70,3 68,7	0,288
	b) 100 ccm NH_3-Elution	5 ccm	58 109	15,55 14,78	780 1090	ca. 0,0
	c) 100 ccm Phosphatelution	5 ccm	64	8,92	174	0,125
131	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	32,5 43	3,16 0,45	44,7 45,4	0,445
	b) 100 ccm NH_3-Elution	5 ccm	59,5	4,02	92,5	0,218
132	220 ccm Adsorbat	5 ccm	57 72	2,97 0,81	78,5 78,6	0,56
	a) 142 ccm 1. Elution	5 ccm	78 95	14,75 13,50	647 635	0,045
	b) 255 ccm 2. Elution	5 ccm	102 135,5	15,55 15,15	1495 1505	0,034
133	a) 143 ccm Adsorbat	5 ccm	30,5 37	7,53 5,95	69,5 70,5	0,407
	b) 180 ccm 1. Elution	5 ccm	33 60	16,38 15,87	845 910	0,029
	c) 138 ccm 2. Elution	5 ccm	43 62	13,03 11,08	251 244	0,130
134	a) 325 ccm Adsorbat	5 ccm	77,5	3,17	108	0,60
	b) 340 ccm 1. NH_3-Elution	5 ccm	78 681	17,03 13,05	3025 4120	0,015

Digitized by Google

	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
134	c) 400 ccm 2. NH_3-Elution . . .	5 ccm	77,5 679	17,20 15,80	3860 9900	ca. 0,006
	d) 332 ccm Phosphatelution . .	5 ccm	62,5 87,5	10,77 8,55	234 255	0,288
135	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	44	−2,78	29,7	0,673
	b) 50 ccm NH_3-Elution	5 ccm	36 46,5	16,34 15,77	740 730	0,013
	c) 100 ccm Elution, Hefeauszug mit wenig Bleiacetat	5 ccm	19,5 50	9,00 1,16	53,7 57	0,39
	d) 100 ccm Elution, Hefeauszug mit überschüssigem Bleiacetat	5 ccm	19,5 49,5	11,34 5,00	80 84	0,248
136	a) 3600 ccm Hefeauszug	5 ccm	31,5 44	3,21 0,25	44,7 45,2	16,0
	b) 75 ccm eingeengte Elution . .	0,5 ccm	26,5 50	6,47 0,60	52,8 53,8	2,85
137	a) 100 ccm Hefeauszug mit Bleiacetat gereinigt	5 ccm	25,5 40,5	3,23 0,80	36,2 44,3	0,50
	b) 100 ccm NH_3-Elution	5 ccm	36	11,55	150	0,138
	c) 100 ccm Phosphatelution . .	5 ccm	32 54	8,37 3,38	80,5 87	0,25
138	a) 100 ccm Hefeauszug	5 ccm	60	−0,51	56	0,358
	b) 100 ccm Waschwasser . . .	5 ccm	71 86	14,03 12,90	534 497	0,084
	c) 100 ccm rückständiges Adsorbat	5 ccm	42,5 60,5	9,51 7,13	126 131,5	0,154
139	a) 500 ccm Invertinlösung . . .	2,5 ccm	27 40	7,04 3,75	58 60,5	3,38
	b) 520 ccm Elution	2,5 ccm	26 42	7,90 3,41	58,5 60,5	3,38
140	a) 400 ccm Invertinlösung . . .	5 ccm	33 40	−1,15 −2,5	28,4 27,5	2,86
	b) 126 ccm Elution	1,25 ccm	34 53,5	3,67 −0,31	50 51,8	1,98
141	a) 300 ccm 1. Elution aus Tonerde	1,25 ccm	41,5 58,5	6,15 3,07	80 81	3,0

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge–Zeit-Quotient
141	220 ccm 2. Elution	5 ccm	69	−3,07	44	1,15
	b) 500 ccm Elution aus Calciumphosphat	1,25 ccm	32 75,5	10,63 3,81	119 115	3, 2
142	a) 130 ccm Tonerdeelution . . .	1,25 ccm	52,5 75	8,82 5,67	140 138	0,7
	b) 260 ccm Invertinlösung nach Zufügen des Kaolins	2,5 ccm	52 74,3	16,00 15,15	855 830	0,11
143	a) 0,92 g Invertinpräparat . . .	0,00338 g	14 31	9,00 2,82	89 40,5	6,58
	b) 295 ccm Elution	1,25 ccm	27	7,00	57	4,13
144	a) 1000 ccm Invertinlösung . .	0,625 ccm	22,5	9,30	64	25,0
	b) 375 ccm 1. Elution	1,25 ccm	33,5	−2,71	22,3	13,2
	150 ccm 2. Elution	1,25 ccm	43,5	−3,3	27	4,5
145	a) 250 ccm Präparatlösung . . .	0,25 ccm	40	5,70	73,5	13,6
	b) 1100 ccm Elution	0,5 ccm	94	8,50	237	9,3
146	a) 2000 ccm Präparatlösung . .	1,25 ccm	51	−0,2	50	32,0
	b) 300 ccm eingeengte Elution .	0,25 ccm	29,5	8,82	79	15,3
147	a) 17,6 g Präparat	0,0025 g	32,5 47	9,30 6,65	92 96	75
	b) 1970 ccm Elution	1,25 ccm	76,5	−2,70	53	29,8
148	a) 485 ccm Präparatlösung . . .	1,25 ccm	34 47	4,47 1,50	55,2 55,5	7,0
	b) 2550 ccm Elution	2,5 ccm	49 105	12,70 8,00	262 250	4,1
149	a) 520 ccm Phosphatelution s. 139 b	—	—	—	—	3,38
	b) 790 ccm Dialysat	5 ccm	45 55,5	2,10 0,28	57,2 57,0	2,77
150	a) 500 ccm Phosphatelution s. 141 b	—	—	—	—	3,61
	b) 390 ccm Dialysat	1,25 ccm	81 122	4,62 0,53	133 129,5	2,42
151	a) 285 ccm Elution	0,5 ccm	36	6,20	70	8,15
	b) 430 ccm Dialysat	1,25 ccm	24	5,35	42,5	8,07

Digitized by Google

	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
	a) 300 ccm Elution	0,25 ccm	40	6,77	82,5	14,5
	b) 488 ccm Dialysat	0,25 ccm	54	10,00	171	11,0
	a) 100 ccm Präparatlösung . . .	0,25 ccm	51	4,30	76,5	5,25
	b) 240 ccm Dialysat	0,25 ccm	76,5 96,5	8,84 5,80	192 180	5,15
4	a) 105 ccm Elution	0,025 ccm	168	7,00	356	11,7
	b) 205 ccm Dialysat	0,25 ccm	43 56,5	5,05 2,40	74,6 74,0	11,1
5	a) 390 ccm Elution	1,25 ccm	43 55,5	8,72 6,80	114 116	2,7
	b) 645 ccm Dialysat	2,5 ccm	66 77	3,10 1,50	92,7 91,0	2,8
6	a) 310 ccm Elution	0,25 ccm	70 81	12,85 12,10	424 400	3,1
	b) 380 ccm Dialysat	1,25 ccm	39 51	9,30 7,35	113 113	2,68
7	a) 2,50 g Präparat	0,00635 g	21 39	2,27 −2,92	26,5 24,8	15,2
	b) 500 ccm Mutterlauge	1,25 ccm	38	−0,88	34,2	11,7
3	a) 1,00 g Präparat, siehe 157a .	—	—	—	—	6,06
	b) 185 ccm Mutterlauge	1,25 ccm	27,5	0,20	29,2	5,08
	a) 50 ccm Kaolinelution, siehe 154a	—	—	—	—	5,63
	b) 155 ccm Uranelution	0,25 ccm	58 85	10,30 7,65	201 198	3,1
	Davon 142 ccm zur Dialyse angesetzt	—	—	—	—	2,84
	c) 226 ccm Dialysat	1,25 ccm	48,5 57	5,90 3,80	81,7 82,3	2,2
	d) 226 ccm filtriert	1,25 ccm	35,5	9,90	113	1,6
	e) nach 3 Wochen Stehen, 210 ccm 0,109 g Trockensubstanz enthaltend	1,25 ccm	60,5	8,30	152	1,11
	a) 50 ccm Kaolinelution, siehe 154a	—	—	—	—	5,63
	b) 165 ccm Mutterlauge	0,25 ccm	37	13,11	229	2,9

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
160	c) 193 ccm Dialysat	1,25 ccm	43 58	4,25 1,10	68,7 66	2,3
	d) nach 3 Wochen Stehen, Trockengehalt 0,140 g	1,25 ccm	56,5	4,40	90,5	1,65
161	a) Hefeauszug	2,5 ccm	28,5 46,5	7,22 3,01	63,5 65	—
	b) 13,5 Liter Hefeauszug mit 40 Proz. Aceton verdünnt und mit Kaolin behandelt	2,5 ccm	73,5	3,07	103	52,3
	c) 14,3 Liter Mutterlauge	2,5 ccm	67,5	15,37	900	6,35
	d) 1850 ccm Tonerdeelution	0,25 ccm	47	13,10	300	24,8
	e) 37 ccm eingeengte Elution	0,025 ccm	70	−0,52	65,3	23,6
	f) 2,367 g Präparat	0,00558 g	17,5 27,5	2,30 −2,10	22,4 20,5	20,3
162	a) 13,5 Liter Kaolin gereinigter Hefeauszug	2,5 ccm	58,5	5,80	110	49,5
	b) 2650 ccm Elution	1,25 ccm	55	4,80	93,5	22,5
	c) 2,22 g Präparat	0,0031 g	40 47,5	1,40 −0,63	47 44	16,0
163	a) 13,5 Liter Kaolin gereinigter Hefeauszug	2,5 ccm	57	7,00	123	44
	b) 1800 ccm Elution	1,25 ccm	46	4,85	78	18,4
	c) 1,40 g Präparat	0,0025 g	27,5 41	5,20 1,40	48,5 47,5	11,7
164	Hefe und Hefeauszug siehe 34.					
	a) 24 Liter acetonhaltiger Auszug aus dem Wert des Hefeauszugs berechnet	—	—	—	—	92
	b) 4 Liter Elution	2,5 ccm	51	−0,8	44,5	35,8
	c) 190 ccm eingeengte Elution	0,025 ccm	60	10,45	210	36
	d) 5,42 g Präparat	0,00635 g	21	2,27	26,5	33
165	a) 25 L. Hefeauszug (ohne Aceton)	5 ccm	23,5	4,37	38	132
	b) 13,1 g Präparat	0,0050 g	34,5 41,5	4,22 2,20	54 54	52,3
166	Präparat	0,012 g	5 28	8,13 −4,4	12,2 12,5	—

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
167	Präparat	0,0106 g	28,5	−2,1	20,8	—
168	a) 75 ccm eingeengte Elution . .	0,25 ccm	22	0,00	22	13,6
	b) 0,426 g Präparat	0,0025 g	12,5	4,25	20,1	8,5
			20	0,25	20,3	
169	a) 5 Liter Hefeauszug.	2,5 ccm	55	5,70	103	20
			65	4,50	105	
	b) 1,24 g Präparat	0,0024 g	13,5	12,30	66,2	11,4
			23	9,80	71,2	
			58,5	1,70	70,2	
170	a) 7 Liter Hefeauszug.	2,5 ccm	125	0,0	125	22,3
	b) 0,95 g Präparat	0,0034 g	14	9,00	39	6,8
			31	2,82	40,3	
171	a) 3,83 g Präparat	0,005 g	32,5	3,70	48	16,3
	b) 250 ccm filtrierte Präparatlösung, siehe 145 a	—	—	—	—	13,6
	c) 1100 ccm Elution siehe 145 b .	—	—	—	—	9,25
	d) 490 ccm dialysierte Elution. .	1,25 ccm	24	5,35	42,5	9,25
	e) 0,383 g Präparat	0,0025 g	24,5	−2,35	17,2	9,20
172	a) 0,92 g Präparat siehe 143 a. .	—	—	—	—	6,58
	b) 295 ccm Elution siehe 143 b .	—	—	—	—	4,13
	c) 0,181 g Präparat	0,0025 g	14	1,82	17,0	4,22
			20	−1,08	17,2	
173	a) 17,62 g Präparat, siehe 147 a .	—	—	—	—	75
	b) 1970 ccm Elution siehe 147 b .	—	—	—	—	30
	c) 208 ccm eingeengte und gestandene Elution.	0,025 ccm	168	7,00	356	23
	d) 255 ccm dialysierte und gestandene Elution vor dem Eindampfen; Trockengehalt 0,41 g	0,25 ccm	50	5,60	91,2	11,1
			62,5	3,55	92,0	
174	a) 2,2 g Präparat vom Wert 2,8 (siehe 162 c) und 2,2 g Präparat vom Wert 2,34 (siehe 161 f) waren vermischt worden . . .	—	—	—	—	34,2
	b) Präparatlösung, siehe 146 a .	—	—	—	—	32,0

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Produkt
174	c) Elution, siehe 146a	—	—	—	—	15,3
	d) Dialyse, siehe 152	—	—	—	—	11,0
	e) weitere Dialyse, siehe 153 . .	—	—	—	—	5,13
	f) 0,142 g Präparat	0,0005 g	35 49,5	8,00 5,00	85,0 84,8	3,33
175	a) 1. Bestimmung	0,005 g	18 34	11,03 6,98	70,5 73,7	—
	b) nach Aufbewahren über P_2O_5	0,0141 g	23 31	5,1 2,42	40,4 44,5	—
	c) nach Stehen an der Luft (auf trockenes Präparat berechnet) .	0,01938 g	25	−0,60	23	—
	d) nach Stehen über P_2O_5 . . .	0,005 g	82	6,40	168	—
	e) nach Stehen an der Luft (auf trockenes Präparat berechnet) .	0,00469 g	61,5 109	3,50 −2,00	89 80	—
176	a) 1. Bestimmung	0,0106 g	28,5	−2,1	20,8	—
	b) nach Stehen über P_2O_5 . . .	0,0257 g	11	2,17	14,1	—
	c) nach Stehen an der Luft (Präparat feucht abgewogen) . . .	0,005 g	23 52	9,70 2,30	71 66	—
177	a) Präparat, siehe 166.					
	b) 0,208 g zu 100 ccm Wasser gelöst und nach 3 Tagen bestimmt	5 ccm	48	−2,35	33,9	—
	c) nach 3 Wochen wieder bestimmt	2,5 ccm	77,5	−1,08	68,5	—
	d) nach $1^1/_2$ Jahren	5 ccm	47,5 60	17,20 17,30	∞	—
178	1. a) 3,17 g Präparat	0,00398 g	28 39,5	5,50 2,30	50,5 50,2	15,8
	b) 1020 ccm Lösung nach 14 Tagen	1,25 ccm	44 56	4,50 2,90	72,0 72,0	11,4
	2. a) 1,471 g Präparat, siehe 163c	—	—	—	—	12,2
	b) 295 ccm Lösung nach 14 Tagen	0,25 ccm	44,5 61,5	12,75 11,10	248 242	4,8
	c) nach weiteren 14 Tagen . .	1,25 ccm	39 50,5	3,80 1,10	59,0 58,0	4,08

Digitized by Google

Nr.	Enzymmaterial	Menge	Beobachtungszeit	Drehung im 2 d-Rohr	Nulldrehungszeit	Menge-Zeit-Quotient
178	3. a) 2,062 g Präparat	0,005 g	25,5 40	8,30 4,85	65 64	12,8
	b) 100 ccm Lösung nach 14 Tagen	0,25 ccm	44	−0,75	39,8	10
	c) dieselbe nach weiteren 14 Tagen	0,25 ccm	41,5	−0,15	40,6	10
179	a) Lösung des Präparates sofort.	0,25 ccm	51,5 69,5	5,20 2,40	90,4 91,0	—
	b) nach 5 Tagen, in Jenaer Glas gestanden	0,25 ccm	50 62,5	5,60 3,55	91,2 92	—
	c) im Silbergefäß 2 Tage gestanden	0,25 ccm	52,3 65	5,30 2,95	93 91	—
	d) in gewöhnlichem Glas 8 Tage gestanden	0,25 ccm	59,5	3,50	88	—

Über Azide, Anthranile und Azoderivate des Anthrachinons[1];

von *Ludwig Gattermann* † und *Hans Rolfes.*

[Mitteilung aus dem Chemischen Institut der Universität Freiburg.]

(Eingelaufen am 19. Oktober 1920.)

Durch Einwirken von Natriumazid auf wäßrige Lösungen von 1- und 2-Anthrachinondiazosulfat bilden sich nach den Angaben von A. Schaarschmidt[2]) die

[1]) Vorstehende gemeinsame Arbeit war bereits einige Zeit vor dem Ableben Gattermanns vollendet worden. Nach seinem Tode übergebe ich sie nunmehr der Öffentlichkeit. Rolfes.

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. **49**, 1632 (1916).

Digitized by Google

entsprechenden Azide. Diese entstehen auch auf dem in der Benzolreihe üblichen Wege über Diazoperbromide und Ammoniak. Zum 1-Azidoanthrachinon endlich gelangten Gattermann und Ebert[1]), als sie das von Wacker[2]) erstmals beschriebene 1-Anthrachinonazohydroxylamid mit Essigsäureanhydrid in Reaktion brachten. Diese zuletzt angeführte Darstellungsweise, die in vorliegender Arbeit an verschiedenen substituierten Anthrachinonen ausprobiert wurde, bewährte sich in der 1-Reihe recht gut.

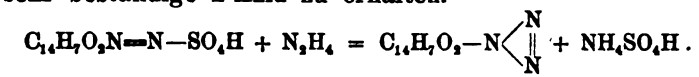
Die auf solchem Wege erhaltenen substituierten 1-Azide gingen beim Erhitzen in Benzollösung leicht unter Stickstoffentwicklung in sehr stabile Verbindungen über. Schaarschmidt (l. c.) erhielt den einfachsten Repräsentanten dieser Klasse von Verbindungen durch Erhitzen von 1-Anthrachinonazid und bezeichnete ihn als *Benzoylenanthranil.* Gattermann und Ebert stellten dieser Konstitutionsformel mit allem Vorbehalt eine weitere zur Seite, nämlich die des Semiazoantrachinons, in der der Stickstoff einwertig angenommen wurde. Indessen ist es in der 2-Reihe trotz vieler Bemühungen nicht gelungen, die Azide in die entsprechenden stickstoffärmeren Verbindungen zu überführen, was nach der Semiazotheorie zu erwarten war. Da ferner das Anthranil der Benzolreihe in ganz analoger Weise aus o-Azidobenzaldehyd entsteht, so mag zunächst auch weiterhin an der zwangloseren Anthranilkonstitution der Anthrachinonverbindungen festgehalten werden.

Die untersuchten Anthranile zeigten alle bezüglich ihrer Farbe eine wesentliche Aufhellung gegenüber den Ausgangsaminen. In konzentrierter Schwefelsäure gelöst und mit etwas Borsäure erwärmt, gaben sie prachtvoll fluorescierende Lösungen. Durch Natriumsulfid konnten sie leicht in die ihnen zugrunde liegenden Amine zurückverwandelt werden.

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. **49**, 2117 (1916).
[2]) Ber. d. d. chem. Ges. **35**, 3923 (1902).

Digitized by Google

Zu den eingangs erwähnten Darstellungsmethoden der Azide können wir nunmehr noch zwei weitere hinzufügen, die recht befriedigende Ausbeuten lieferten. So gelang es in der 2-Reihe, aus dem Diazosulfat mit Hydrazin beim Erwärmen in wäßriger Lösung glatt das sehr beständige 2-Azid zu erhalten.



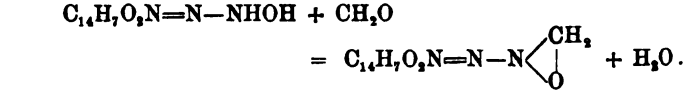
Versuche, das 1-Azid aus dem 1-Anthrachinondiazosulfat mit Hydrazin herzustellen, gaben zwar nicht das gewünschte Azid. Vielmehr wurde so in guter Ausbeute die Anthranilverbindung erhalten, indem das primär gebildete 1-Azid sogleich unter Stickstoffentwicklung in die beständigere Stickstoffverbindung überging. Dies ist wohl der schnellste Weg, um wenigstens das 1-Anthrachinonanthranil darzustellen. Um geringe Verunreinigungen auszuschalten, die das Krystallisationsvermögen des Anthranils erheblich herabsetzen, wurde bei dieser Reaktion in alkoholisch-wäßriger Lösung gearbeitet.

Versuche, vorstehende Methode auch auf substituierte Derivate des 1-Aminoanthrachinons zu übertragen, schlugen fehl, indem die Methode nicht zu analysenreinen Anthranilen führte. Es beruht dies darauf, daß in diesen Fällen die reduzierende Wirkung des Alkohols auf die Diazogruppe schneller eintritt als bei dem unsubstituierten Aminoanthrachinon, so daß diese in siegreiche Konkurrenz zu dem Umsatz mit dem Hydrazin treten kann. Es erfolgte daher teilweiser Ersatz der Diazogruppe durch Wasserstoff. Lieferte die Reaktion mit Hydrazin *ohne* Alkoholzusatz bei einfachem 1-Aminoanthrachinon schon kein reines Anthranil, so verlief vollends die Einwirkung des Hydrazins auf rein wäßrige Lösungen diazotierter, substituierter Amine in gänzlich anderer Weise. Das gelöste Diazosalz verharzte nämlich weitgehend, wobei freie Stickwasserstoffsäure entstand.

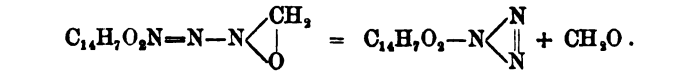
Eine weitere Methode, um zu 1-Anthrachinonazid zu gelangen, die auch für die substituierten Anthra-

Digitized by Google

chinonderivate anwendbar ist, besteht in der Einwirkung von Formaldehyd auf die alkalische Lösung des eingangs erwähnten Diazohydroxylamids. Bereits in der Kälte bildet sich ein in Alkali unlöslicher blauer Niederschlag, der höchstwahrscheinlich in folgender Weise entsteht:



Dieser Körper ist jedoch äußerst unbeständig und verwandelt sich bereits in der Kälte, schneller beim vorsichtigen Erwärmen in einen hellgelben Niederschlag, der sich aus Methylalkohol bei behutsamem Arbeiten umkrystallisieren läßt. Er erwies sich als identisch mit dem von Gattermann und Ebert beschriebenen Azide. Es hat also beim Stehen oder Erwärmen eine Abspaltung von Formaldehyd stattgefunden:



Durch diese neue Reaktion ist also letzten Endes aus dem Diazohydroxylamide Wasser ausgetreten, was die genannten Autoren zuerst durch Einwirken von Essigsäureanhydrid in Pyridinlösung erreichten.

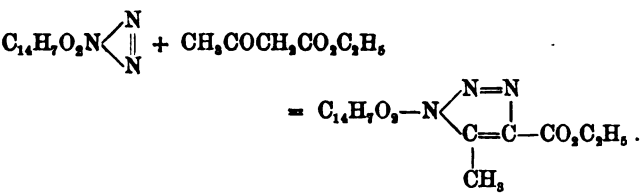
Während die Anthranile sich nicht ohne weiteres nitrieren ließen, lieferten die Azide mit rauchender Salpetersäure in der Kälte glatt Nitroazide, die aber infolge ihrer leichten Zersetzlichkeit nicht in reinem Zustande isoliert wurden. So wurden über die Nitroazide aus 1-Azid letzten Endes 1,4-Nitroanthrachinonanthranil, aus 1,4-Chlorazidoanthrachinon das 1,2-Chlornitroanthrachinon-4-anthranil dargestellt. Das auf anderem Wege rein erhaltene 1,4-Nitroazid zeigte durchaus nicht die hoch explosiven Eigenschaften des von Schindhelm[1]) beschriebenen 1,2-Nitroazides, indem jenes bei langsamem

[1]) Schindhelm, Dissert. Freiburg 1919.

Digitized by Google

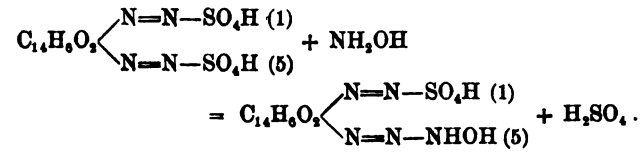
Erhitzen zunächst allmählich Stickstoff abgab und dann den Schmelzpunkt des Nitroanthranils zeigte; höchstens bei schnellem Erhitzen direkt über der Flamme konnte die Substanz zum Verpuffen gebracht werden.

Anthrachinon-2-azid ließ sich leicht in der von Dimroth angegebenen Weise mit Acetessigester zu dem entsprechenden Triazolkörper kondensieren, was beim 1-Azid infolge seiner Zersetzlichkeit nicht gelang.



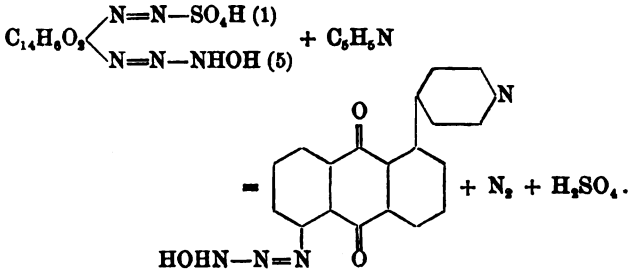
Der 2-Anthrachinonylmethyltriazolcarbonsäureäthylester bildet eine vollständig farblose, gut krystallisierte Substanz.

Ein Versuch, das bereits von Schaarschmidt als Dianthranil beschriebene 1,5-Dianthraniloanthrachinon auf dem Gattermann-Ebertschen Wege darzustellen, schlug fehl. Es reagierte nämlich bei der Umsetzung des doppelt diazotierten 1,5-Diamins mit 2 Molekülen Hydroxylamin nur die *eine* Diazosulfatgrnppe in gewünschter Weise, während die andere unverändert blieb, so daß also die folgende Verbindung entstanden war:



Überraschenderweise entstand aus diesem Körper beim Lösen in heißem Pyridin unter heftiger Stickstoffentwicklung und beträchtlicher, teilweiser Verharzung eine Verbindung, in der der Analyse zufolge der Diazosulfatrest durch den einwertigen Pyridylrest ersetzt war, so daß demnach ein Derivat des Pyridylanthrachinons vorliegt.

Digitized by Google

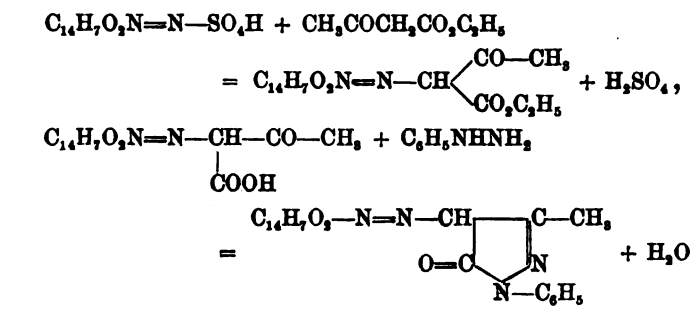


Auch dieses 1-Pyridyl-5-diazohydroxylamidoanthrachinon konnte über das nicht isolierte Azid in das entsprechende prächtig krystallisierende Anthranil übergeführt werden.

Die Untersuchungen, ob nicht ganz allgemein im Anthrachinon der Diazosulfatrest durch Pyridyl ersetzt werden könnte, zeitigten leider keine Erfolge. Vielmehr wurde bei der Einwirkung von Pyridin auf Anthrachinondiazosulfat Anthrachinon erhalten neben einem in sehr geringer Ausbeute entstehenden, in verdünnten Mineralsäuren löslichen und daraus mit Alkalien fällbarem, basischen, niedrig schmelzenden Körper, der aus verdünntem Alkohol in farblosen Krystallen erhältlich war.

Wir haben die Substanz, die sicherlich keinen Anthrachinonylrest enthält und die vermutlich ein Pyridinderivat ist, nicht weiter untersucht. Die Anwendung anderer tertiärer Amine an Stelle von Pyridin, so das Dimethylanilin, ergab Arylazoanthrachinone, die dann glatter und in besserer Ausbeute durch Kuppeln der einzelnen Komponenten in wäßriger Lösung erhalten wurden. Es wurden so eine Reihe von gemischten 1- und 2-Azoanthrachinonen hergestellt durch Kombination von Anthrachinondiazosulfat mit Aminen und Phenolen der Benzol- und Naphthalinreihe. Auch aliphatische Komponenten, wie Acetessigester, lieferten Azoverbindungen in der 1- und 2-Reihe, aus denen schließlich nach Verseifen der Azoester zu Azoacetessigsäuren durch Kondensation mit Phenylhydrazin Anthrachinonazopyrazolonderivate hergestellt wurden.

Digitized by Google



Diese gemischten Azoanthrachinone, die in der wissenschaftlichen Literatur bislang nicht beschrieben waren, zeigen alle ein außerordentliches Krystallisationsvermögen. Jedoch sind die Schmelzpunkte im allgemeinen unscharf.

Azoverbindungen, welche beiderseits der Anthrachinonreihe angehören, wurden von Schindhelm durch Einwirken von Chlor und Alkali auf die primären Amine gewonnen. Gattermann und Ebert kamen beim Erhitzen des 1-Anthranils durch Polymerisation ebenfalls zum Azoanthrachinon und zwar in zwei stereoisomeren Formen. Diese Azoanthrachinone konnten mit Leichtigkeit durch Phenylhydrazin zu Hydrazoanthrachinonen reduziert werden. Gegen alle Erwartungen gelang es nun trotz vielfacher und umfassender Versuche mit zahlreichen Reduktionsmitteln nicht, in analoger Weise die gemischten Hydrazoanthrachinone aus den entsprechenden Azoverbindungen zu bekommen. Vielmehr blieben diese unverändert, oder sie wurden vollständig gespalten und zu Aminen reduziert.

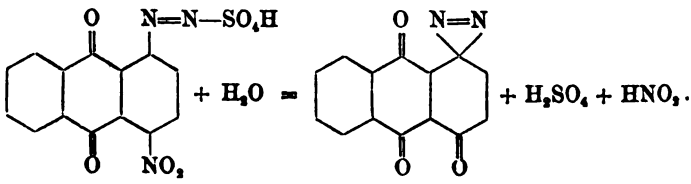
Die in vorstehender Arbeit so häufig benötigten sauren Diazosulfate wurden nach den Angaben Gattermanns[1]) durch Diazotieren der Amine in konzentrierter Schwefelsäure mit Natriumnitrit hergestellt. Sie fallen meist als in Wasser oder in gesättigter Kochsalzlösung schwer lösliche krystallisierte Niederschläge aus, bei

[1]) Diese Annalen **393**, 139 (1912).

Digitized by Google

vorsichtigem Zusatz von Eis zu der Schwefelsäurelösung unter gleichzeitiger äußerer Kühlung. Nach dem Trocknen auf Ton halten sich die Diazosulfate, unter Lichtabschluß im Exsiccator aufgehoben, recht lange, ohne sich zu zersetzen, wobei höchstens allmählich eine oberflächliche Braunfärbung eintritt. Durch Alkohol werden, wie gelegentlich schon erwähnt, wäßrige Lösungen von 1- und 2-Anthrachinondiazosulfat bereits in der Kälte — schneller beim Erwärmen — leicht zu Anthrachinon reduziert, das dabei direkt in schönen, farblosen Nadeln aus den Lösungen auskrystallisiert. Hierbei konnte beobachtet werden, daß die Reduktion des 1-Diazosulfats unvergleichlich viel schneller als die der 2-Diazoverbindung eintrat.

Gelegentlich der Darstellung des 1,4-Nitroanthrachinondiazohydroxylamids konnten wir noch eine interessante Beobachtung machen bezüglich der Bindungsfestigkeit der Substituenten in para-Stellung im Anthrachinon. Als nämlich eine klare Lösung des 1,4-Nitroanthrachinondiazosulfats längere Zeit stehen gelassen wurde, schieden sich prachtvolle intensiv rote Krystallnadeln aus. Die Analyse stimmte auf einen Körper, dem die Konstitution eines p-Anthrachinon-chinondiazids zukommt. Hierfür spricht besonders der Farbenumschlag des kaum gefärbten Nitrodiazosulfats in die tiefrote neue Verbindung, was wohl auf die chinoide Struktur derselben zurückzuführen ist. Es mag also wohl die in para-Stellung locker gebundene Nitrogruppe durch das Wasser gegen Hydroxyl ausgetauscht worden und dann der saure Schwefelsäurerest der Diazogruppe mit dem Hydroxylwasserstoff ausgetreten sein.



Digitized by Google

Ein ähnlicher Fall unter gleicher Entstehungsbedingung war in der Naphthalinreihe schon gefunden worden.

Durch vorsichtiges Erhitzen in konz. Schwefelsäure wurde das p-Anthrachinon-chinondiazid zu Chinizarin verkocht.

Versuche.

2-Anthrachinonazid.

Man versetzt eine wäßrige Lösung von 5 g trockenem 2-Diazosulfat nach Zusatz von 50 ccm Alkohol mit einer Lösung von 5 g Hydrazinsulfat. Nach dem Aufkochen wird der hellgelbe Niederschlag abgesaugt und aus Alkohol krystallisiert. Helle Nadeln, die sich im Lichte allmählich bräunen. Schmelzp. 162°.

0,1320 g gaben 20,2 ccm Stickgas bei 21° und 732 mm Druck.

	Ber. für $C_{14}H_7O_2N_3$ (249)	Gef.
N	16,87	16,68

N-2-Anthrachinonylmethyltriazolcarbonsäureäthylester.

Zu 1 g 2-Anthrachinonazid, in der Wärme in der eben nötigen Menge absoluten Alkohols gelöst, wird eine Lösung von 0,1 g metallischem Natrium und 0,5 g Acetessigester in 5 ccm absolutem Alkohol hinzugegeben. Die Flüssigkeit färbt sich hierbei sofort dunkel und scheidet, bis zum Sieden erhitzt, nach dem Erkalten einen krystallinischen Niederschlag aus, der, abfiltriert und aus heißem Alkohol umgelöst, in farblosen Rhomben krystallisiert erhalten werden kann. In den meisten organischen Lösungsmitteln ist die Substanz leicht löslich. Schmelzp. 201° unter Zersetzung.

0,1208 g gaben 0,2915 CO_2 und 0,0477 H_2O.
0,1291 g „ 14,2 ccm Stickgas bei 25° und 740 mm Druck.
0,1202 g „ 12,8 ccm Stickgas bei 20° und 743 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{15}O_4N_3$	Gef.	
C	66,47	66,09	—
H	4,19	4,44	—
N	11,63	11,88	11,84

Digitized by Google

1-Anthrachinonanthranil.

Eine klare Lösung von 5 g getrocknetem 1-Diazosulfat in der eben nötigen Menge Wasser wurde mit 50 ccm Alkohol und *sofort* darauf mit einer konzentrierten, warmen, wäßrigen Lösung von 4 g Hydrazinsulfat versetzt. Es entsteht sogleich ein heller Niederschlag, der beim Erwärmen oder längerem Stehen Stickstoff zu entwickeln beginnt. Man erhitzt unter Umrühren bis zum Sieden und saugt nach dem Erkalten den nunmehr intensiv orangeroten, sich gut absetzenden Niederschlag ab. Aus Xylol wurden braune Nadeln erhalten, die keinen charakteristischen Schmelzpunkt zeigen, dagegen sich in der Wärme mit konz. Schwefelsäure zu 1-Amino-4-oxyanthrachinon umlagern lassen. Durch Reduktion mit Natriumsulfid entsteht 1-Aminoanthrachinon.

0,1045 g gaben 6,1 ccm Stickgas bei 20° und 774 mm Druck.
0,1301 g „ 0,3643 CO_2 und 0,0390 H_2O.

	Ber. für $C_{14}H_7O_2N$	Gef.
C	76,01	76,37
H	3,19	3,35
N	6,33	6,50

1-Anthrachinonazid.

1 g frisch dargestelltes, krystallisiertes 1-Anthrachinondiazohydroxylamid wurde in 10 ccm Pyridin in der Wärme gelöst, darauf durch Zugeben von 10 ccm Wasser als sehr feinkörniger Niederschlag wieder ausgefällt. Die Suspension wurde nun mit 20 ccm 40 prozentiger Formaldehydlösung und 20 ccm 1 prozentiger Natronlauge geschüttelt. Die durch das Alkali hervorgerufene violette Farbe des Gemisches geht nach wenigen Minuten, schneller beim Erwärmen auf 30°, in hellgelb über. Das auf einem Tonteller abgepreßte Azid wird vorsichtig aus Methylalkohol krystallisiert und so in hellgelben Nadeln von den in der Literatur angegebenen Eigenschaften erhalten.

Digitized by Google

1,4-Nitroanthrachinonanthranil.

5 g aus Methylalkohol krystallisiertes 1-Anthrachinonazid wurden unter Eiskühlung allmählich in 50 ccm rote, rauchende Salpetersäure eingetragen, wobei sich das Azid mit tiefbrauner Farbe löste. Gegen Ende der Nitrierung scheidet sich das Nitroazid krystallinisch aus. Nach kurzem Stehen wurde das Reaktionsprodukt in viel Wasser gegossen und auf einer Nutsche abgesaugt. Das trockene Nitroazid, das schon bei Zimmertemperatur bei längerem Stehen sich zersetzt, wurde unter Zusatz von etwas Tierkohle in siedendem Benzol gelöst, wobei lebhafte Stickstoffentwicklung eintrat. Nach dem Erkalten krystallisierten lange, braune Nadeln des Nitroanthranils. Die Substanz ist in Pyridin äußerst leicht löslich mit brauner Farbe. Schmelzp. 244—245° unter Zersetzung.

Erhitzt man 1,4-Nitroanthrachinonanthranil mit einer Spur Borsäure in konz. Schwefelsäure auf 170°, so entsteht eine schöne, intensiv rotbraune, fluorescierende Lösung.

0,1173 g gaben 0,2708 CO_2 und 0,0200 H_2O.
0,1100 g „ 10,4 ccm Stickgas bei 15° und 734 mm Druck.
0,0783 g „ 7,8 ccm „ „ 26° „ 742 mm „

	Ber. für $C_{14}H_8O_4N_2$	Gef.	
C	63,16	62,96	—
H	2,28	1,91	—
N	10,53	10,64	10,73

Reduktion des 1,4-Nitroanthrachinonanthranils zu 1,4-Diaminoanthrachinon.

Man erhitzt 1 g feingepulvertes Nitroanthrachinonanthranil mit 30 ccm einer Natriumsulfidlösung, die hergestellt wird durch Sättigen einer Lösung von 15 g Natron in 50 ccm Wasser mit Schwefelwasserstoff und nachherigem Versetzen derselben mit einer Lösung von weiteren 15 g Natron in 50 ccm Wasser. Nach kurzem Erwärmen wandelt sich die Substanz in eine voluminöse,

Digitized by Google

braunviolette Masse um, die abfiltriert und mit viel Wasser gut ausgewaschen wird. Um aus dem Rohprodukt das Diamin krystallisiert zu erhalten, wird der Niederschlag mit viel kochender verdünnter Salzsäure ausgezogen und das Filtrat mit Alkali versetzt. Aus verdünntem Pyridin krystallisieren dunkle violette Nadeln vom Schmelzp. 165°. Mischschmelzpunkt mit reinem 1,4-Diamin: 165°.

4-Nitro-1-diazohydroxylamidoanthrachinon.

In 20 ccm konz. Schwefelsäure löst man in gelinder Wärme 5 g reines, umkrystallisiertes 1-Amino-4-nitroanthrachinon und setzt hierzu in der Käite eine Lösung von 1,7 g Natriumnitrit in 15 ccm konz. Schwefelsäure. Nach 12 stündigem Stehen im Eisschrank gießt man die Schwefelsäurelösung auf zerkleinertes Eis, wobei man zweckmäßigerweise auch von außen kühlt. Es scheidet sich ein aus hellgelben Nadeln bestehender Niederschlag von 1,4-Nitroanthrachinondiazosulfat aus, der abgesaugt und, ohne ausgewaschen zu werden, in 1 Liter kaltem Wasser gelöst wird. Die von wenig ungelösten Flocken filtrierte Lösung versetzt man rasch mit einer Lösung von 1,5 g Hydroxylaminchlorhydrat, wobei man jedes längere Stehenlassen des gelösten Diazosulfats tunlichst vermeiden muß. Nach 8 Stunden hat sich das Nitrodiazohydroxylamid vollständig in Form braunroter Flocken abgeschieden. Aus Pyridin krystallisieren rote Rhomben. Beim Umlösen in Pyridin muß die Substanz unbedingt trocken sein, da sonst leicht Zersetzung eintritt. Das Diazohydroxylamid krystallisiert mit 1 Mol. Pyridin, das es aber nur unvollständig im Vakuum über konz. Schwefelsäure verliert. Um pyridinfreie Analysensubstanz zu gewinnen, wurde bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank auf 70° erhitzt.

0,1341 g gaben 0,2648 CO_2 und 0,0326 H_2O.
0,1112 g „ 17,1 ccm Stickgas bei 15° und 733 mm Druck.

Digitized by Google

	Ber. für $C_{14}H_6O_5N_4$	Gef.
C	53,83	53,85
H	2,58	2,72
N	17,39	17,28

4-Nitro-1-azidoanthrachinon.

Man suspendiert 1 g fein zerriebenes Nitrodiazohydroxylamid in 25 ccm Pyridin in der Kälte und versetzt darauf mit 7 ccm frisch destilliertem Essigsäureanhydrid. Unter geringer Erwärmung tritt sofort Lösung ein, und nach wenigen Minuten scheidet sich das Nitroazid in gelben Nadeln aus. Bei schnellem Erhitzen verpufft das Azid; langsam im Schmelzpunktsröhrchen erhitzt: Schmelzp. 245° unter Zersetzung. (Schmelzpunkt des Nitroanthrachinonanthranils 245°.)

0,1103 g gaben 18,0 ccm Stickgas bei 11° und 739 mm Druck.

	Ber. für $C_{14}H_6O_4N_4$	Gef.
N	19,05	18,82

4-Nitroanthrachinon-1-anthranil.

In 14 ccm Benzol wurden 0,4 g Nitroazid zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten krystallisierten braune Nadeln aus. Schmelzp. 245°. Mischschmelzpunkt mit dem durch Nitrieren des Azides erhaltenen Produkt 245°.

Bei dem vorstehenden diazotierten 1-Nitro-4-aminoanthrachinon wurde noch folgende Beobachtung gemacht.

1,4-Anthrachinon-chinondiazid.

Wäscht man das auf die oben angegebene Weise erhaltene 1,4-Nitrodiazosulfat einige Male auf der Nutsche mit etwas Wasser nach, zur Entfernung überschüssiger Säure, und löst es dann in viel kaltem Wasser auf, so scheidet sich nach 12stündigem Stehen ein Niederschlag in feuerroten Nadeln ab. Nach dem Trocknen verpuffte die Substanz beim Erhitzen. Die Untersuchung ergab, daß die Nitrogruppe ausgetauscht worden war.

Digitized by Google

0,1322 g gaben 0,3250 CO_2 und 0,0256 H_2O.
0,1210 g „ 11,8 ccm Stickgas bei 16° und 744 mm Druck.

	Ber. für $C_{14}H_6O_3N_2$	Gef.
C	67,20	67,05
H	2,42	2,17
N	11,20	11,07

Durch Verkochen des Chinondiazids wurde Chinizarin gewonnen. In 10 ccm konz. Schwefelsäure wurde 0,5 g Chinondiazid kurze Zeit auf 180° erhitzt. Die anfangs orangefarbene Lösung färbt sich karminrot. Bei dem Eingießen der Lösung in Wasser erhält man einen orangefarbenen Niederschlag, der sich in Alkalien blau löst und sich als stickstofffrei erweist. Aus Eisessig braunrote Nadeln. Schmelzp. 197°.

1-Diazohydroxylamido-4-chloranthrachinon.

Unter Eiskühlung wurde in 50 ccm konz. Schwefelsäure 4,5 g fein gepulvertes Natriumnitrit allmählich eingetragen und danach bis zur völligen Lösung erhitzt. Hierzu wurde in der Kälte eine Lösung von 13 g 1-Amino-4-chloranthrachinon in 40 ccm konz. Schwefelsäure hinzugegeben. Nach 6stündigem Stehen im Eisschrank wurde auf 200 g zerkleinertes Eis gegossen, das abgesaugte Diazosulfat in 900 ccm kaltem Wasser gelöst und mit einer wäßrigen Lösung von 4 g Hydroxylaminchlorhydrat versetzt. Nach 12stündigem Stehen war der Gefäßinhalt zu einem voluminösen roten Brei erstarrt. Aus Pyridin scheidet sich die Substanz in prächtigen, roten, langen Nadeln aus, die sich in Alkalien violett lösen. Das Hydroxylamid krystallisiert mit einem Molekül Pyridin.

1. 0,5607 g (frisch aus Pyridin krystallisiert) verloren im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure nach 48 Stunden 0,1148 g Pyridin.

	Ber. für $C_{14}H_8O_3N_2Cl + C_5H_5N$	Gef.
Pyridin	20,75	20,48

Digitized by Google

2. 0,1799 g gaben 0,0842 AgCl.
0,1052 g „ 13,2 ccm Stickgas bei 17° u. 744 mm Druck.

	Ber. für $C_{14}H_8O_3N_3Cl$	Gef.
Cl	11,75	11,58
N	13,93	14,18

1-Azido-4-chloranthrachinon.

Man löst 3 g Diazohydroxylamid in 20 ccm Pyridin in der Wärme klar auf, kühlt sodann unter der Wasserleitung schnell ab und versetzt die so erhaltene Suspension von fein krystallisiertem Diazohydroxylamid in Pyridin mit 5 ccm frisch destilliertem Essigsäureanhydrid. Unter geringer Erwärmung geht die Substanz in Lösung, und nach kurzer Zeit krystallisiert das Chlorazid analysenrein in gelben Nadeln aus.

Darstellung nach der Formaldehydmethode.

2 g frisches Diazohydroxylamid, in 20 ccm Pyridin gelöst und mit 10 ccm Wasser ausgefällt, schüttelt man in einem Kölbchen mit 15 ccm 40 prozentiger Formaldehydlösung und 15 ccm 1 prozentiger Natronlauge. Die Farbe des anfänglich tief blauvioletten Reaktionsgemisches geht sehr bald in rötlichgelb über. Der helle Niederschlag wird scharf abgesaugt und noch feucht aus Methylalkohol vorsichtig umkrystallisiert. Das Chlorazid ist krystallisiert und in Lösung noch zersetzlicher als das 1-Azid und geht dabei in das bereits beschriebene[1]) Anthranil über.

0,1640 g gaben 0,0825 AgCl.
0,0804 g gaben 11,0 ccm Stickgas bei 18° und 738 mm Druck.

	Ber. für $C_{14}H_8O_3N_3Cl$	Gef.
Cl	12,87	12,44
N	14,84	15,25

2-Nitro-4-chloranthrachinon-1-anthranil.

Unter Eiskühlung wurde 1 g frisch dargestelltes Chlorazid in 5 ccm rote Salpetersäure eingetragen, wobei

[1]) Haller, Dissert. Freiburg 1919.

Digitized by Google

mit dunkelbrauner Farbe Lösung eintrat. Nach dem Eingießen des Reaktionsgemisches in viel Wasser wurde der Niederschlag abgesaugt. Beim Lösen der vollkommen trocknen Substanz in siedendem Benzol unter Tierkohlezusatz trat lebhafte Stickstoffentwicklung ein. Nach dem Erkalten schieden sich kleine braune, zu Kugeln verfilzte Nadeln aus, die nach nochmaligem Umlösen aus Eisessig in gelben Nadeln krystallisierten und den Zersetzp. 187° zeigten. Das Anthranilderivat ist leicht löslich in Eisessig, Benzol, Xylol und Pyridin.

0,1619 g gaben 0,0778 AgCl.
0,1069 g „ 9,2 ccm Stickgas bei 18° und 740 mm Druck.

	Ber. für $C_{14}H_8O_4N_2Cl$	Gef.
Cl	11,89	11,80
N	9,32	9,62

1-Diazohydroxylamidoanthrachinon-5-diazosulfat.

Man diazotiert eine Lösung von 10 g 1,5-Diaminoanthrachinon in 50 ccm konz. Schwefelsäure mit einer Lösung von 6 g Natriumnitrit in 50 ccm konz. Schwefelsäure. Die nach 7stündigem Stehen erhaltene Diazolösung wird auf Eis gegossen und der aus rhombischen Krystallen bestehende grauweiße Niederschlag von 1,5-Bisdiazosulfat abgesaugt. Das Diazosalz trägt man in 800 ccm kaltes Wasser ein, worin es sich mit tief rotbrauner Farbe löst, und filtriert sodann von wenig Ungelöstem ab. Nach Zugeben einer Lösung von 4 g Hydroxylaminchlorhydrat zum Filtrat beginnt sofort ein aus kleinen Nädelchen bestehender roter Niederschlag von Diazohydroxylamidodiazosulfat sich abzuscheiden. Nach 12 Stunden ist die Reaktion beendigt. Das Diazohydroxylamidodiazosulfat löst sich in viel heißem Wasser mit permanganatroter, in kaltem Alkali spielend leicht mit violetter Farbe. Zur Analyse wurde ein kleiner Teil des Rohproduktes aus Wasser von 75° umkrystallisiert. Die reine Substanz bildet bronzefarbene Nadeln, die beim trocknen Erhitzen heftig verpuffen

Digitized by Google

unter Abscheidung eines voluminösen, flockigen Rußes. Durch Kochen der Diazosulfatlösung mit Chlorbariumlösung läßt sich Schwefelsäure qualitativ nachweisen.

0,0803 g gaben 12,9 ccm Stickgas bei 11° und 744 mm Druck.
0,1543 g „ 0,0935 $BaSO_4$.

	Ber. für $C_{14}H_9O_7N_5S$	Gef.
N	17,90	17,65
S	8,19	8,32

1-Pyridyl-5-diazohydroxylamidoanthrachinon.

Man löst 2 g trocknes 1-Diazohydroxylamidoanthrachinon-5-diazosulfat in der eben nötigen Menge Pyridin unter Erwärmung auf. Es tritt dabei eine außerordentlich stürmische Stickstoffentwicklung ein, während ein großer Teil der Substanz verharzt. Nach Aufhören der Gasentwicklung wird die tiefschwarzrote Lösung von den harzigen Bestandteilen, die zum größten Teil an den Wandungen des Gefäßes haften bleiben, abfiltriert. Beim Erkalten scheiden sich feuerrote, lanzettförmige Krystalle ab, die nach zweimaligem Umkrystallisieren analysenrein erhalten werden können. Infolge der weitgehenden Verharzung ist die Ausbeute an reinem 1-Pyridyl-5-diazohydroxylamidoanthrachinon eine geringe. Dabei ist es bei diesem Versuche unbedingt erforderlich, daß das Ausgangsmaterial vollkommen trocken ist, da sonst die Ausbeute eine noch wesentlich schlechtere wird.

Die Substanz krystallisiert ohne Pyridin. Im Vakuum über konz. Schwefelsäure verloren die Krystalle innerhalb 50 Stunden nichts an Gewicht.

0,1313 g gaben 0,3180 CO_2 und 0,0446 H_2O.
0,1082 g „ 15,2 ccm Stickgas bei 14° und 744 mm Druck.

	Ber. für $C_{19}H_{12}O_3N_4$	Gef.
C	66,27	66,05
H	3,52	3,80
N	16,28	16,10

1-Pyridylanthrachinon-5-anthranil.

Eine Suspension von 1 g krystallisiertem 1-Pyridyl-5-diazohydroxylamidoanthrachinon in 25 ccm Pyridin

Digitized by Google

wurde mit 5 ccm Essigsäureanhydrid versetzt und bis zur Lösung gelinde erwärmt. Die nunmehr hell-braungelb gewordene Lösung wurde nach dem Filtrieren in viel Wasser gegossen. Der abgesaugte hellgelbe Niederschlag wurde auf einem Tonteller abgepreßt und in wenig Pyridin erhitzt. Unter lebhafter Stickstoffentwicklung trat Lösung ein. Nach dem Erkalten krystallisierte das Anthranilderivat in prächtigen, goldgelben, glänzenden Plättchen aus. Schmelzp. über 300°. Die Substanz ist in Alkohol leicht, in Pyridin sehr leicht löslich.

0,0849 g gaben 7,4 ccm Stickgas bei 17° und 744 mm Druck.

	Ber. für $C_{10}H_{10}O_2N_2$	Gef.
N	9,4	9,8

1-Anthrachinonazodimethylanilin.

1 g trocknes 1-Diazosulfat wurde mit 20 ccm frisch destilliertem Dimethylanilin erhitzt, wobei unter teilweiser Verharzung und kräftiger Stickstoffentwicklung die Lösung sich braunschwarz färbte. Nach dem Erkalten schieden sich aus dem überschüssigen Dimethylanilin Krystalle ab, die nach Umlösen in Pyridin in dunkelbrauen Prismen erhalten wurden. Schmelzp. 249°, unter Zersetzung. In Pyridin, Anilin und Nitrobenzol ist der Azokörper mit brauner Farbe leicht, in verdünnten Mineralsäuren und in Eisessig mit intensiv violetter Farbe ziemlich schwer löslich, in Alkohol ist er nahezu unlöslich.

In besserer Ausbeute erhält man den Azokörper durch Kuppeln in wäßriger Lösung. Zu einer klaren Lösung von 5 g Diazosulfat in Wasser gibt man eine Lösung von 1,5 g Dimethylanilin in 10 ccm Alkohol und läßt das Reaktionsgemisch unter häufigem Umschütteln 4 Stunden stehen. Es scheidet sich dabei ein dunkelbrauner, flockiger, schlecht filtrierbarer Niederschlag aus, der nach Absaugen auf einer Nutsche und Trocknen auf einem Tonteller aus Pyridin umkrystallisiert wird.

Digitized by Google

0,1297 g gaben 0,3550 CO_2 und 0,0592 H_2O.
0,1184 g „ 12,6 ccm Stickgas bei 15° und 730 mm Druck.

	Ber. für $C_{22}H_{17}O_2N_3$	Gef.
C	74,35	74,65
H	4,82	5,11
N	11,83	11,90

1-Anthrachinonazoanilin.

Eine wäßrige Lösung von 2 g 1-Diazosulfat wurde mit 0,6 g Anilin, gelöst in 5 ccm Alkohol, versetzt. Nach häufigem Umrühren wurde nach 3 Stunden der voluminöse brangerote Niederschlag abgesaugt. Aus Pyridin ließen sich rote Nadeln erhalten, die in Anilin und Nitrobenzol leicht löslich sind. Schmelzp. 211° unter Zersetzung.

0,0813 g gaben 9,6 ccm Stickgas bei 15° und 729 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{13}O_2N_3$	Gef.
N	12,84	13,19

1-Anthrachinonazo-p-toluidin.

Aus einer Lösung von 1-Diazosulfat in Wasser und 1 g p-Toluidin in Eisessig, nach Zusatz von 40 ccm einer 20prozentigen Natriumacetatlösung zur Zurückdrängung der Azidität, als massiger roter Niederschlag. Aus Pyridin tiefrote Nadeln. Schmelzp. 230°. Leicht löslich in den meisten hochsiedenden organischen Lösungsmitteln.

0,1227 g gaben 13,2 ccm Stickgas bei 10° und 742 mm Druck.

	Ber. für $C_{21}H_{15}O_2N_3$	Gef.
N	12,3	12,5

1-Anthrachinonazophenol.

2 g Diazosulfat mit einer Lösung von 1 g Phenol in Natronlauge gaben eine tiefbraune Lösung des Azophenolats. Nach 12stündigem Stehen wurde der Azofarbstoff mit verdünnter Salzsäure in rostbraunen Flocken gefällt. Aus Nitrobenzol oder Pyridin in feuerroten spitzwinkligen Tafeln, die in Alkohol mit brauner Farbe löslich sind. Das 1-Anthrachinonazophenol krystallisiert mit einem Mol. Pyridin, was es bei längerem Stehen an der Luft leicht wieder verliert.

Digitized by Google

0,1264 g gaben 11,0 ccm Stickgas bei 14° und 746 mm Druck.
0,1146 g „ 10,2 ccm Stickgas bei 15° „ 746 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{12}O_3N_2 + C_5H_5N$	Gef.	
N	10,32	9,99	10,12

1-Anthrachinonazoresorcin.

Aus wäßrigen Lösungen von 3 g Diazosulfat und 2 g Resorcin. Krystallisiert aus Anilin in roten Nadeln, mit einem Mol. Anilin. Das Krystall-anilin läßt sich qualitativ nachweisen durch längeres Auskochen des gepulverten Azokörpers mit verdünnter Salzsäure, Alkalisieren und Ausführen der Rungeschen Anilinreaktion mit Chlorkalk. In Eisessig und Pyridin ist der Azofarbstoff kaum, in Anilin schwer löslich.

0,1100 g gaben 9,3 ccm Stickgas bei 10° und 738 mm Druck.
0,1118 g „ 9,2 ccm Stickgas bei 12° „ 740 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{12}O_4N_2 + C_6H_5NH_2$	Gef.	
N	9,61	9,78	9,46

1,5-Aminoanthrachinonazoanilin.

Das nach der Vorschrift von Gattermann durch Halbdiazotierung von 1,5-Anthrachinondiamin gewonnene 1,5-Aminoanthrachinondiazosulfat (2 g) wurde mit 1 g Anilin, in 10 ccm Alkohol gelöst, wäßrig gekuppelt. Aus verdünntem Pyridin nach dem Kochen mit etwas Tierkohle leuchtend rote Nadeln. Schmelzp. 216°.

0,1130 g gaben 15,8 ccm Stickgas bei 12° und 746 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{14}O_4N_4$	Gef.
N	16,37	16,21

1,5-Diazohydroxylamidoanthrachinonazidodimethylanilin.

Zu einer filtrierten Lösung von 3 g 1,5-Diazohydroxylamidoanthrachinondiazosulfat in einem Liter Wasser von 70° wurde eine alkoholische Lösung von 2 g Dimethylanilin zugegeben. Nach 12stündigem Stehen wurde der Niederschlag verarbeitet. Aus Pyridin krystallisiert er in dunkelroten, rechteckigen Tafeln mit

Digitized by Google

einem Mol. Pyridin. Unlöslich in verdünnten Säuren, löslich in Alkalien mit violetter Farbe.

0,1126 g gaben 20,0 ccm Stickgas bei 10° und 746 mm Druck.

	Ber. für $C_{22}H_{16}O_3N_6 + C_5H_5N$	Gef.
N	19,88	20,13

1,5-Dimethylanilinazoanthrachinonanthranil.

Eine Suspension von 1 g Azodiazohydroxylamid in 15 ccm Pyridin wurde in einem Kölbchen mit 3 g frischem Essigsäureanhydrid bis zur völligen Lösung gelinde erwärmt. Nach Einstellen in Eis wird hernach das Reaktionsprodukt einige Stunden sich selbst überlassen. Die innerhalb 12 Stunden sich ausscheidenden braunen Krystalle werden in siedendem Pyridin umgelöst, wobei lebhafte Stickstoffentwicklung eintritt. Nach dem Erkalten glänzende, braunschwarze Rhomben, die unlöslich in Alkalien, sich in verdünnten Säuren mit permanganatroter Farbe lösen. Schmelzp. 229° unter Zersetzung.

0,1183 g gaben 0,3036 CO_2 und 0,0497 H_2O.
0,1175 g „ 15,6 ccm Stickgas bei 11° und 738 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{16}O_2N_4$	Gef.
C	69,73	69,99
H	4,68	4,70
N	15,22	15,29

1-Anthrachinonazo-2-naphthol.

In bekannter Weise aus den Komponenten. Aus Nitrobenzol in feuerroten Nadeln, die sich in konz. Schwefelsäure tiefblau lösen. Schmelzp. über 290°.

0,1287 g gaben 8,4 ccm Stickgas bei 11° und 738 mm Druck.

	Ber. für $C_{24}H_{14}O_2N_2$	Gef.
N	7,40	7,52

1,5-Anthrachinonbisazoanilin.

Aus Nitrobenzol leuchtend rote Rhomben, die bei 251° verpuffen. Außer in Nitrobenzol und Anilin ist die Azoverbindung in den üblichen Lösungsmitteln kaum löslich.

Digitized by Google

0,1144 g gaben 18,6 ccm Stickgas bei 15° und 744 mm Druck.

	Ber. für $C_{26}H_{18}O_2N_6$	Gef.
N	18,84	18,54

1,5-Anthrachinonbisazo-p-toluidin.

Aus Nitrobenzol dunkelrote Nadeln. Schmelzp. 246° unter Zersetzung. In Pyridin sehr schwer löslich.

0,1278 g gaben 19,8 ccm Stickgas bei 14° und 744 mm Druck.

	Ber. für $C_{28}H_{22}O_2N_6$	Gef.
N	17,72	17,75

2-Anthrachinonazodimethylanilin.

Aus Pyridin schwarze Nadeln, die sich in verdünnten Mineralsäuren und Eisessig mit violetter Farbe lösen. Schmelzpunkt unscharf.

0,1076 g gaben 11,1 ccm Stickgas bei 16° und 746 mm Druck.

	Ber. für $C_{22}H_{17}O_2N_3$	Gef.
N	11,83	11,74

2-Anthrachinonazoanilin.

Aus Nitrobenzol in gelben Nadeln.

0,1135 g gaben 12,8 ccm Stickgas bei 10° und 746 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{13}O_2N_3$	Gef.
N	12,84	13,19

2-Anthrachinonazo-p-toluidin.

Aus Nitrobenzol rote Rhomben. Eine Lösung des Farbstoffes in Pyridin wird durch Zusatz von Alkali olivgrün gefärbt. Schmelzp. 227° unter Zersetzung.

0,1116 g gaben 11,5 ccm Stickgas bei 9° und 746 mm Druck.

	Ber. für $C_{21}H_{15}O_2N_3$	Gef.
N	12,3	12,1

2-Anthrachinonazophenol.

Aus Nitrobenzol oder Pyridin krystallisieren hellrote Nadeln. Aus Pyridin krystallisieren sie mit einem Mol. Krystallpyridin, das sie an der Luft leicht wieder verlieren.

Digitized by Google

0,1134 g gaben 10,7 ccm Stickgas bei 19° und 744 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{13}O_3N_3 + C_5H_5N$	Gef.
N	10,32	10,59

2-Anthrachinonazo-2-naphthol.

Aus Nitrobenzol rote Nadeln, die sich in konz. Schwefelsäure mit intensiv blauer Farbe lösen. Schmelzpunkt 250°. Der Farbstoff ist in Anilin und Nitrobenzol leicht löslich.

0,1254 g gaben 8,4 ccm Stickgas bei 19° und 746 mm Druck.

	Ber. für $C_{24}H_{14}O_3N_2$	Gef.
N	7,40	7,52

2-Anthrachinonazo-1-naphthylamin.

Aus Nitrobenzol schwarze Nadeln, die sich in konz. Schwefelsäure mit grüner Farbe lösen. Schmelzpunkt über 290°.

0,1351 g gaben 13,3 ccm Stickgas bei 16° und 746 mm Druck.

	Ber. für $C_{24}H_{15}O_2N_3$	Gef.
N	11,15	11,21

1-Anthrachinonazoacetessigester.

Zu einer filtrierten Lösung von 2 g 1-Diazosulfat in der erforderlichen Menge Wasser wurde eine alkoholische Lösung von 3 g Acetessigester und 60 ccm Natriumacetatlösung hinzugegeben. Nach 2stündigem Stehen und häufigem Umrühren wurde der orangerote Niederschlag abgesaugt und aus Eisessig umkrystallisiert. Man erhält orangegelbe Nadeln, die bei 152° zu einer klaren Flüssigkeit schmelzen. Der Azokörper ist in Alkohol kaum löslich.

0,1257 g gaben 0,3027 CO_2 und 0,0512 H_2O.
0,1232 g „ 8,2 ccm Stickgas bei 21° und 742 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{16}O_5N_2$	Gef.
C	65,92	65,68
H	4,43	4,56
N	7,69	7,36

Digitized by Google

1-Anthrachinonazoacetessigester-phenylhydrazon.

Man löst 1 g 1-Azoacetessigester in 15 ccm Eisessig in der Wärme auf und versetzt hierauf mit einer Lösung von 0,6 g frisch destilliertem Phenylhydrazin in 5 ccm Eisessig. Die Lösung färbt sich sofort intensiv dunkel, und nach kurzer Zeit scheidet sich beim Erwärmen das in Eisessig schwer lösliche Phenylhydrazon in Form eines aus Nadeln bestehenden orangeroten Krystallbreies aus. Durch Umlösen aus Pyridin erhält man ziegelrote Nadeln. Schmelzp. 263° unzersetzt.

0,1272 g gaben 14,7 ccm Stickgas bei 23° und 740 mm Druck.

	Ber. für $C_{26}H_{22}O_4N_4$	Gef.
N	12,34	12,61

1-Anthrachinonazoacetessigsäure.

Die Verseifung des 1-Azoacetessigesters geht in alkoholischer Lösung bereits bei Zimmertemperatur außerordentlich leicht vor sich. Man suspendiert 1 g Azoacetessigester in 50 ccm Alkohol, worin der Ester nur sehr schwer löslich ist, und versetzt mit einer Lösung von 1 g Kaliumhydroxyd in 10 ccm Wasser. Unter spontanem Erwärmen beginnt sich in wenigen Minuten das Reaktionsgemisch in einen orangeroten, voluminösen, nadeligen Krystallbrei umzuwandeln. Nachdem man die Verseifung durch kurzes Erwärmen auf dem Wasserbade vollendet hat, wird das in heißem Wasser mit orangeroter Farbe nur sehr schwer lösliche Kaliumsalz abgesaugt. Man übergießt dieses hierauf in einem Kölbchen mit 50 ccm 16 prozentiger Salzsäure und erwärmt, bis sich alles Kaliumsalz in die citronengelb gefärbte Säure umgewandelt hat. Aus Eisessig krystallisiert die Säure in langen gelben Nadeln. Schmelzp. 251° unter Zersetzung. Die 1-Azoacetessigsäure ist in Eisessig sehr viel schwerer löslich als der Ester.

0,1045 g gaben 0,2460 CO_2 und 0,0286 H_2O.
0,1269 g „ 9,4 ccm Stickgas bei 22° und 742 mm Druck.

Digitized by Google

	Ber. für $C_{18}H_{12}O_5N_2$	Gef.
C	64,27	64,20
H	3,60	3,74
N	8,39	8,15

1-Anthrachinonazo-1,3-phenylmethyl-5-pyrazolon.

In der eben nötigen Menge siedendem Eisessig löst man 1 g 1-Azoacetessigsäure und setzt hierzu in der Siedehitze eine Lösung von 1 g Phenylhydrazin in 7 ccm Eisessig. Die Lösung färbt sich hierbei intensiv dunkel. Man erhitzt nun so lange, bis nach kurzer Zeit sich Flocken abzuscheiden beginnen; hierauf läßt man abkühlen, wobei ein nadeliger Krystallbrei sich abscheidet. Aus Pyridin erhält man leuchtend rote Nadeln. Schmelzpunkt 252°.

0,1344 g gaben 0,3493 CO_2 und 0,0560 H_2O.
0,1212 g „ 15,0 ccm Stickgas bei 24° und 742 mm Druck.

	Ber. für $C_{24}H_{16}O_3N_4$	Gef.
C	70,59	70,88
H	4,41	4,66
N	13,73	13,53

(Ber. auf 1-Anthrachinonazoacetessigsäurephenylhyrazon für $C_{24}H_{18}O_4N_4$: C 67,60; H 4,23; N 13,14.)

2-Anthrachinonazoacetessigester.

Die Kombination von 10 g 2-Diazosulfat und 3 g Acetessigester in wäßriger Lösung unter Zusatz von Natriumacetatlösung erfolgte in gleicher Weise wie in der 1-Reihe. Aus Eisessig krystallisieren citronengelbe, kleine Nadeln. Schmelzp. 221° zu einer klaren gelben Flüssigkeit. Das Azoderivat ist in Alkohol kaum löslich.

0,1193 g gaben 8,4 ccm Stickgas bei 24° und 742 mm Druck.

	Ber. für $C_{20}H_{16}O_5N_2$	Gef.
N	7,69	7,66

2-Anthrachinonazoacetessigester-phenylhydrazon.

Eine Lösung von 1 g 2-Azoacetessigester in 15 ccm Eisessig wurde in der Hitze mit einer Lösung von 0,6 g

Digitized by Google

Phenylhydrazin in 5 ccm Eisessig versetzt. Unter Dunkelfärbung der Flüssigkeit scheidet sich nach kurzem Kochen ein krystallinischer Niederschlag aus, der nach dem Erkalten abgesaugt wird. Aus viel Eisessig, worin der Azofarbstoff relativ schwer löslich ist, krystallisieren karminrosarote rhombische Krystalle. Schmelzp. 247°.

0,1231 g gaben 13,8 ccm Stickgas bei 25° und 740 mm Druck.

	Ber. für $C_{36}H_{22}O_4N_4$	Gef.
N	12,34	12,10

2-Anthrachinonazoacetessigsäure.

Die Verseifung des Esters zur Säure geht in der 2-Reihe nicht mit derselben Leichtigkeit wie in der 1-Reihe. Man versetzt eine Suspension von 2 g Azoacetessigester in 100 ccm Alkohol mit einer Lösung von 2 g Kaliumhydroxyd in 15 ccm Wasser und erhitzt eine Stunde am Rückflußkühler zum Sieden. Dabei schlägt die nach dem Zugeben des Alkalis anfänglich violettbraune Farbe des Kolbeninhalts allmählich in grüngelb um, und nach Beendigung der Reaktion erfüllt das voluminöse Kaliumsalz breiartig den Kolben. Es wird hierauf abgesaugt und mit 16 prozentiger Salzsäure zerlegt. Aus Eisessig erhält man blaßgelbe, kleine Tafeln. Schmelzp. 247°. Das Kaliumsalz der Säure ist in heißem Wasser nur sehr schwer mit gelber Farbe löslich. Die freie Säure ist in Eisessig schwer löslich.

0,1247 g gaben 9,8 ccm Stickgas bei 24° und 742 mm Druck.

	Ber. für $C_{18}H_{12}O_5N_2$	Gef.
N	8,3	8,5

2-Anthrachinonazo-1,3-phenylmethyl-5-pyrazolon.

Zu 2 g 2-Azoacetessigsäure, gelöst in der eben nötigen Menge siedendem Eisessig, setzt man eine Lösung von 1,5 g Phenylhydrazin in 10 ccm Eisessig hinzu. Aus der kochenden Lösung scheidet sich nach wenigen Minuten der schwerlösliche Azofarbstoff krystallinisch aus.

Digitized by Google

Er ist in Eisessig kaum, in Pyridin sehr schwer löslich. Aus Nitrobenzol erhält man bronzefarbene Blättchen. Schmelzp. 268°.

0,1265 g gaben 15,7 ccm Stickgas bei 24° und 740 mm Druck.

	Ber. für $C_{14}H_{16}O_3N_4$	Gef.
N	13,73	13,47

Über freie Ammoniumradikale [1]).

I. Das Benzoylpyridinium;

von *Ernst Weitz*, *Adolf Roth* † [2]) und *Annemarie Nelken*.

(Aus den Chemischen Instituten der Universitäten Straßburg und Münster.)

Den Ausgangspunkt für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen, die zu einem valenzchemisch interessanten Resultat geführt haben, bildeten auch valenzchemische Betrachtungen, die aber nach einer ganz anderen Richtung zielten. Bekanntlich gelingt es nicht oder nur höchst unvollkommen [3]), Säurechloride — analog

[1]) Gekürzt vorgetragen auf der Naturforscherversammlung in Nauheim am 22. September 1920 von E. W.

[2]) Herr Adolf Roth aus Straßburg-Ruprechtsau, der das Benzoylpyridinium im Sommersemester 1914 im Straßburger Institut zuerst dargestellt hat, ist nach vierjährigem Waffendienst am 9. August 1918 als Leutnant d. R. gefallen. Ich betrauere in ihm einen sehr geschickten und begabten Mitarbeiter, der zu großen Hoffnungen berechtigte. Die zu Kriegsbeginn unterbrochene Untersuchung wurde im Herbst 1919 von Fräulein A. Nelken im Münsterschen Institut fortgesetzt. E. W.

[3]) Durch Reduktion von Benzoylchlorid mit Natriumamalgam erhielt Klinger [Ber. d. d. chem. Ges. 16, 994 (1883)] geringe Mengen von Benzil neben dem sog. Isobenzil, d. i. dem Benzoylester des 7,7'-Dioxystilbens. Möglicherweise ist hier das Benzil sogar durch sekundäre Umwandlung entstanden.

Digitized by Google

der Wurtz-Fittigschen Reaktion — durch Metalle zu Diketonen zusammenzuschließen, während sie sonst, z. B. gegen H_2O, NH_3 usw., sehr reaktionsfähig sind. Werner[1]) und später Staudinger[2]) haben wahrscheinlich gemacht, daß diese glatten Umsetzungen auf einer vorherigen Addition an die C=O-Doppelbindung und nachträglichen HCl-Abspaltung beruhen. Die Trägheit der Gruppe $\begin{matrix}-C=O\\ |\\ Cl\end{matrix}$ gegenüber den Metallen ist dann analog der geringen Reaktionsfähigkeit des Chlors in der Gruppe $\begin{matrix}-C=C<\\ |\\ Cl\end{matrix}$, also neben der C=C-Bindung. Wie man sich diese Wirkung der C=O- bzw. der C=C-Doppelbindung genauer vorstellen mag, ist einerlei[3]); jedenfalls ist eine Doppelbindung eine Bindung mit freier Valenz, mit Restvalenz, und es ist zu erwarten, daß, wenn man diese Restvalenz in irgendeiner Weise absättigt, ihre störende Wirkung auf das Chlor aufhört. Das gegebene Mittel für die Absättigung von Restvalenzen ist die Bildung von *Komplexverbindungen*, wir haben daher die Einwirkung von Metallen auf die Aluminiumchlorid-Verbindungen von Säurechloriden, speziell von Benzoylchlorid untersucht. Dabei hat sich tatsächlich eine erhöhte Reaktionsfähigkeit gezeigt, die Versuche haben jedoch bisher nicht zu dem gewünschten Resultat geführt.

Es gibt aber noch eine andere Art von Verbindungen der Säurechloride, in welchen das Chlor sehr reaktionsfähig ist und die den Säurerest leicht wieder abgeben,

---

[1]) Lehrbuch der Stereochemie (1904) S. 412.

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. 44, 1640 (1911).

[3]) Wenn — wie H. Finkelstein (Verh. d. Ges. D. Naturforscher und Ärzte 1911, II, 1, 180) annimmt — die Reaktionsfähigkeit der Halogenalkyle auf einem ungesättigten Charakter der C—Cl-Bindung beruht, wofür a. a. O. experimentelle Belege beigebracht sind, so kann durch eine Wechselwirkung der beiden ungesättigten Systeme C—Cl und C=O bzw. C=C sehr wohl die Beweglichkeit des Halogens herabgesetzt werden.

Digitized by Google

das sind die Verbindungen mit den cyclischen Aminen *Pyridin* und *Chinolin*, die im allgemeinen als quaternäre Ammoniumchloride, z. B. N-Benzoylpyridiniumchlorid (s. Formel I, weiter unten) formuliert werden[1]), im übrigen nach der Wernerschen Theorie der Ammoniumsalze dann auch zu den Komplexverbindungen gehören. Diese Verbindungen konnten daher eventuell eine geeignete Form der Säurechloride für die Reduktion zu den 1,2-Diketonen sein. Tatsächlich schien denn auch schon der rohe Reagensglasversuch den Erwartungen zu entsprechen: Während nämlich eine Lösung von Benzoylchlorid in einem indifferenten Mittel, z. B. Xylol, mit Zinkstaub gar nicht reagiert, erfolgt beim Zugeben von *Zink zu einem Gemisch von Benzoylchlorid und Pyridin stürmische Reaktion*, so daß das Ganze ins Sieden kommt. Durch passende Versuchsanordnung kann man die Einwirkung mäßigen, und man erhält dann — *nicht Benzil*, sondern einen Körper, der in *dunkelbraunen*, beinahe bronzeglänzenden *Blättchen* krystallisiert, und dessen Lösungen in organischen Mitteln kräftig rotbraun gefärbt sind.

Diese *Lösungen entfärben sich* durch Oxydation *an der Luft*, je nach dem Lösungsmittel und der Temperatur, mehr oder weniger schnell. Bei Luftabschluß bleiben sie jahrelang unverändert. Die feste, trockne Substanz

[1]) Eine Zeitlang hat man [vgl. Wedekind, diese Annalen **318**, 102 und 116 (1901)] Bedenken gegen diese Auffassung der Pyridinium- usw.-Verbindungen der Säurechloride gehabt, zumal sich letztere mit gewöhnlichen tertiären Aminen nicht zu Acylammoniumchloriden zu vereinigen schienen. Nachdem aber später mehrfach auch Säurechloridverbindungen von offenen tertiären Aminen erhalten worden sind [Vorländer und Nolte, Ber. d. d. chem. Ges. **46**, 3224 (1913); Dehn, Journ. Am. chem. soc. **34**, 1407 (1912); Dehn und Ball, ebenda **36**, 2100 (1914); s. auch Freudenberg und Peters, Ber. d. d. chem. Ges. **52**, 1463 (1919)], scheint kein Grund mehr vorhanden, die Pyridin-Säurechloridverbindungen abweichend zu formulieren; vgl. auch Vorländer, diese Annalen **320**, 100, 105 (1902).

Digitized by Google

ist viel luftbeständiger, wird allerdings im Laufe der Jahre auch allmählich oxydiert.

Der braune Körper hat die prozentische *Zusammensetzung* $C_{12}H_{10}ON = C_5H_5N + C_6H_5CO$; das Zink hat also tatsächlich halogenentziehend gewirkt; es haben sich jedoch dann nicht zwei Benzoylreste zu Benzil vereinigt, sondern das *Pyridin* ist *mit dem Benzoyl verbunden* geblieben.

Für die *Konstitutions*-Ermittelung dieser Verbindung ist wichtig die Feststellung, daß schon bei den mildesten Eingriffen der *Benzoylrest* (als Benzoesäure) abgespalten wird; er muß also noch *am Stickstoff* haften. Außerdem war die *Bestimmung des Mol.-Gewichtes* von entscheidender Bedeutung; denn hatte der Körper das einfache Mol.-Gewicht $C_{12}H_{10}ON$, so mußte er ein Atom mit ungewöhnlicher Valenz, entweder dreiwertigen Kohlenstoff oder vierwertigen Stickstoff enthalten, also ein „Radikal" sein.[1]) Dafür spricht ja auch die kräftige Farbe und die leichte Oxydierbarkeit.

Unsere ersten Mol.-Gewichtsbestimmungen *in siedendem Äthylenbromid* (zur Verhinderung der Oxydation in CO_2-Atmosphäre ausgeführt), ergaben *das einfache* Molekulargewicht $C_{12}H_{10}ON$. Als wir dann eine Kontrolle durch Bestimmung der *Gefrierpunktserniedrigung* vornahmen, ergab sich *in Naphthalin* (Wasserstoffatmosphäre) *das doppelte* Molekulargewicht $(C_{12}H_{10}ON)_2$. *In Phenol* hingegen erhielten wir Werte, die *zuerst* dem *doppelten* Molekül entsprachen, *dann* aber kontinuierlich bis *zum einfachen* Molekulargewicht $(C_{12}H_{10}ON)$ abnahmen, ohne daß dabei eine sonstige Veränderung, etwa Entfärbung, wahrgenommen werden konnte. Wenn wir hingegen sorgfältig jede Spur von Sauerstoff, auch der geringen im Phenol gelösten Menge, ausschlossen[2]), blieben auch

[1]) Über die Möglichkeit, d. h. die Unmöglichkeit einer Formulierung $C_{12}H_9ON$ bzw. $(C_{12}H_9ON)_2$ vgl. weiter unten.

[2]) Vgl. die analoge Wirkung des Luftsauerstoffs beim später zu beschreibenden Dimolekularen des Benzylpyridiniums.

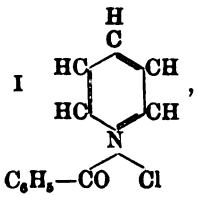
Digitized by Google

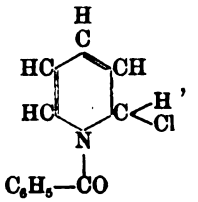
hier die Werte konstant beim doppelten Molekulargewicht stehen. Sobald dann Luft zugelassen wurde, fiel der Gefrierpunkt rasch auch unter den für das einfache Molekulargewicht berechneten Betrag, um, wenn schließlich Entfärbung eingetreten war, etwa beim Werte $\frac{1}{2}(C_{12}H_{10}ON)$ stehen zu bleiben.

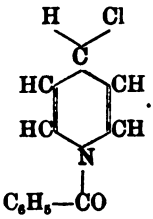
Schließlich haben wir dann wieder eine Bestimmung der *Siedepunktserhöhung* in einem neuen Mittel, *Chlorbenzol* (in CO_2-Atmosphäre), vorgenommen und hier das *einfache Molekulargewicht* ($C_{12}H_{10}ON$) gefunden. Daß dabei nichts von der Substanz oxydiert und dadurch etwa ein niedrigeres Molekulargewicht vorgetäuscht war, konnten wir nachprüfen, indem wir nach dem Erkalten im Siedegefäß mit Brom titrierten (vgl. das Verhalten gegen Brom weiter unten).

Wir haben es also mit einer Verbindung zu tun, die in Lösungen von niedriger Temperatur bzw. in assoziierenden Lösungsmitteln, wie Naphthalin, aus *Doppelmolekülen* besteht, sich aber sehr *leicht in Einzelmoleküle* $C_{12}H_{10}ON$ *spaltet.*[1])

Für dieses Molekül $C_{12}H_{10}ON = C_6H_5CO + C_6H_5N$ ist die einfachste Auffassung die, daß es das dem N-Benzoylpyridiniumchlorid (I) entsprechende freie Ammoniumradikal „*N-Benzoylpyridinium*“ (IV) ist.

I 

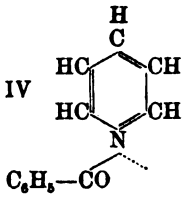
II 

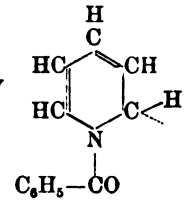
III 

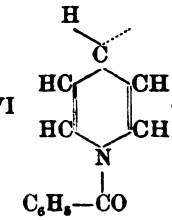
[1]) Die Genauigkeit der Bestimmungen hat bisher nicht soweit gebracht werden können, das *daraus* etwa auf die An- oder Abwesenheit einer *kleinen Menge* von dimerem neben dem monomeren Produkt, und umgekehrt, könnte geschlossen werden. Es sind wesentlich rein chemische Gründe (s. u.), die gegen eine (dimere) Dipyridylformel sprechen.

Digitized by Google

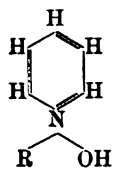
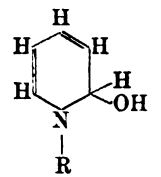
Strukturchemisch mit dieser Formel identisch, nur mit einer anderen Absättigung der Valenzen, also „valenzisomer“ wären die *Formeln* V oder VI *mit dreiwertigem Kohlenstoff*, die sich von Pseudochloriden II oder III ableiten würden.

IV  ,

V  ,

VI  .

Daß die *Umsetzungen der quaternären Pyridinium- bzw. Chinoliniumhalogenide* tatsächlich oft so verlaufen, als ob sie *1,2-* oder *1,4-Dihydropyridinderivate* seien, zeigt die Bildung von 1-Benzoyl-2-cyan-1,2-dihydrochinolin aus Chinolin, Benzoylchlorid und Cyankalium[1]), sowie von 1-Methyl-4-cyan-1,4-dihydrochinolin[2]) aus Chinolinjodmethylat und Cyankalium. Vermutlich erfolgt aber hier, genau wie bei dem bekannten Übergang der Pyridiniumhydroxyde VII in ihre Pseudobasen VIII, die *Umlagerung* der Ammoniumform erst *nach der Umsetzung* des Halogenids.

VII  → VIII  .

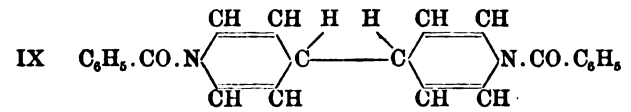
Dann könnte also eventuell ein primär entstandenes *Benzoylpyridinium IV sich nachträglich* in eines der „Methyle“ V oder VI *umgelagert haben.* Auch das halten wir aber für unwahrscheinlich; denn nach allem, was man bisher über dreiwertigen Kohlenstoff weiß, könnten Körper dieser Struktur nicht existenzfähig sein, sondern *müßten sich*

[1]) Reissert, Ber. d. d. chem. Ges. 38, 1606, 1610 (1905).

[2]) Kaufmann u. Albertini, Ber. d. d. chem. Ges. 42, 3738 (1909).

Digitized by Google

zu dimolekularen, farblosen, gesättigten (nicht luftempfindlichen) Tetrahydrodipyridylderivaten (etwa IX) *polymerisieren*, während unsere Substanz auch *im dimolekularen*

IX 

Zustande ihre *Farbe* und ihren ungesättigten Charakter *beibehält.* Es handelt sich bei der dimolekularen[1]) Form wohl weniger um vollwertige chemische Verknüpfung der beiden Moleküle, als um einen Zustand der Assoziation, der von dem stark ungesättigten Charakter der Einzelmoleküle herrührt.

Wir ziehen daher die Formel mit vierwertigem Stickstoff den „Methyl"formeln vor und sehen in dem *Körper $C_{12}H_{10}ON$ das N-Benzoylpyridinium* (IV).

Körper mit vierwertigem Stickstoff (außer dem NO_2) sind schon mehrfach hergestellt worden, so die Salze der Nitrosidisulfonsäure $O{=}N{=}(SO_3H)_2$[2]), das „Porphyrexid" von Piloty und Schwerin[3]) und die Diarylstickoxyde $O{=}N{<}^{R}_{R}$ von Wieland[4]) und seinen Mitarbeitern sowie von Kurt H. Meyer und H. Gottlieb-Billroth.[5]) Alle diese Körper enthalten die Gruppe $>N{=}O$, sind also halbseitige Abkömmlinge des Stickstoffdioxyds; das Benzoylpyridinium gehört einer anderen Körperklasse an; es ist — wenigstens formal[6]) — ein *freies Ammoniumradikal.*

[1]) Möglicherweise kommen auch noch höhere Assoziationsprodukte vor: die Lösung in Nitrobenzol zeigte nämlich anfangs gar keine Gefrierpunktsdepression, was auf einen abnorm großen Molekülkomplex schließen ließe. Erst nach mehreren Stunden sank der Gefrierpunkt und blieb etwa beim Werte für $(C_{12}H_{10}ON)_2$ stehen, um später bis auf den Wert $C_{12}H_{10}ON$ zu fallen.

[2]) Raschig, diese Annalen **241**, 223 (1887), dort auch frühere Literatur; Hantzsch u. Semple, Ber. d. d. chem. Ges. 28, 2744 (1895).

[3]) Ber. d. d. chem. Ges. **34**, 1870, 2354 (1901).

[4]) Ber. d. d. chem. Ges. **47**, 2111 (1914); **53**, 210 (1920).

[5]) Ber. d. d. chem. Ges. **52**, 1476 (1919).

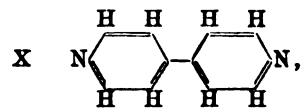
[6]) Vergl. die nachfolgende Abhandlung, S. 195—197.

Digitized by Google

In Lösung sind ganz neuerdings Ammoniumradikale nachgewiesen worden von Emmert[1]) und von Schlubach.[2]) Außerdem ist, abgesehen von dem gewöhnlichen „Ammoniumamalgam", neuerdings ein krystallisiertes Tetramethylammoniumamalgam dargestellt worden.[3])

Die rotbraunen Lösungen des Benzoylpyridiniums könnten erinnern an die Farbe des Stickstoffdioxyds, sie zeigen jedoch ein einfaches Absorptionsspektrum ohne Banden.

Das Benzoylpyridinium hat keine basischen *Eigenschaften*, es wird von verdünnten starken Säuren ebensowenig gelöst oder verändert wie von Wasser oder Alkalien. Auch konz. Salzsäure ist ohne Einwirkung. In Chloroform- oder Nitrobenzollösung hingegen wird es bei andauerndem Schütteln mit 20prozentiger Salzsäure unter Entfärbung zersetzt, desgl. in Eisessig durch Eisessig–Salzsäure. Dabei entsteht *γ,γ'-Dipyridyl* (X),



von dem unten noch die Rede sein wird, außerdem Benzoesäure und eine zweite, noch nicht aufgeklärte Aminbase.

Freies *Chlor und Brom* reagieren so schnell, daß man mit Lösungen der Halogene in Tetrachlorkohlenstoff die Verbindung $C_{12}H_{10}ON$ auf *Farblos titrieren* kann; dabei verbraucht 1 Molekül Substanz 1 Atom Halogen.

Aus dem Reaktionsgemisch hofften wir wieder das Benzoylpyridiniumchlorid (I) erhalten und dies durch Zersetzung mit Wasser in Benzoesäure und Pyridin

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. **53**, 870 (1920); s. a. die nächstfolgende Abhandlung.

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. **53**, 1689 (1920); s. a. die nächstfolgende Abhandlung.

[3]) Mc Coy u. Moore, Journ. Amer. chem. Soc. **33**, 277 (1911); Mc Coy u. West, Zentralbl. 1912, II, 20.

Digitized by Google

rückwärts spalten zu können. Die Abspaltung der *Benzoesäure* trat auch prompt ein; sie beweist, daß der Benzoylrest nicht an Kohlenstoff gebunden war. *Daneben* wurde jedoch wider Erwarten *nicht Pyridin* erhalten, sondern *γ,γ'-Dipyridyl* (X).

Da aus dem Gemisch von Pyridin und Benzoylchlorid das Pyridin leicht regenerierbar ist, konnte also aus Chlor und „Benzoylpyridinium" offenbar das ursprüngliche Benzoylpyridiniumchlorid nicht entstanden sein. Dies ist vielleicht so zu erklären: das Benzoylpyridinium ist für ein Ammonium entschieden auffallend „edel"; denn es wird aus seinem Chlorid bereits durch Zink in Freiheit gesetzt; vermutlich ist daran die negative Substitution am Stickstoff (Acyl statt Alkyl oder Wasserstoff) schuld. Dann muß es aber auch eine relativ kleine Tendenz zur Salzbildung oder „Elektroaffinität" haben, und die Folge davon kann sein, daß — wenn im Molekül die Möglichkeit dazu vorliegt — das Chlor schneller an einer anderen Stelle angreift als am Stickstoff, daß also z. B. das Molekül in einer der valenzisomeren Formen mit dreiwertigem Kohlenstoff (V oder VI) reagiert und ein *Pseudochlorid* (Formel II oder III) liefert. Ein solches könnte bei der Zersetzung auch wieder Pyridin und Benzoesäure liefern; daß tatsächlich Dipyridyl entsteht, ist auf eine Kondensation zurückzuführen, deren Eintritt bei der bekannten großen Reaktionsfähigkeit der analogen N-Alkylpseudobasen (VIII) nichts Merkwürdiges hat und an die Kondensation der N-Alkylchinolinpseudobasen zu Dichinolylderivaten, den sog. „Apocyaninen" erinnert.[1])

Im übrigen müßte von Rechts wegen bei der Abspaltung von zwei Molekülen Benzoylchlorid aus zwei Molekülen des Pseudochlorids III ein *Dihydro*-dipyridyl, entsprechend der Zusammensetzung $(C_5H_5N)_2$, entstehen; wahrscheinlich zersetzt sich dieses schon bei der Aufarbeitung des Rohproduktes, eventuell unter Bildung eines

[1]) A. Kaufmann u. Strübin, Ber. d. d. chem. Ges. 44, 692 (1911).

Digitized by Google

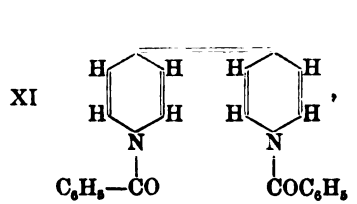
bisher nicht gefaßten, höher hydrierten Dipyridyls, ähnlich wie der Dihydrolutidindicarbonsäureester[1]) durch Salzsäure in das Lutidin- und das Hexahydrolutidinderivat zerfällt.

Etwas weniger schnell als die Halogene wirkt — ebenfalls unter Entfärbung — *Stickoxyd* auf gelöstes Benzoylpyridinium ein. Auch hier wurden beim Aufarbeiten bisher nur *γ,γ'-Dipyridyl* und Benzoesäure gefaßt. Dasselbe gilt für die Einwirkung von Stickstoffdioxyd, welches bereits die feste Substanz schnell entfärbt.

Bei der *Oxydation* des Benzoylpyridiniums *durch Luftsauerstoff* wird ein halbes Atom Sauerstoff aufgenommen, entsprechend dem Verbrauch von einem Atom Halogen. Das farblose Oxydationsprodukt gibt beim Versetzen mit Alkali gleichfalls *γ,γ'-Dipyridyl* und hat sich als *benzoesaures Salz* dieser Base erwiesen.

Es wurde schon erwähnt, daß die *Geschwindigkeit der Oxydation* in den verschiedenen Lösungsmitteln sehr ungleich ist, auch von anderen katalytischen Einflüssen scheint sie noch abhängig zu sein.

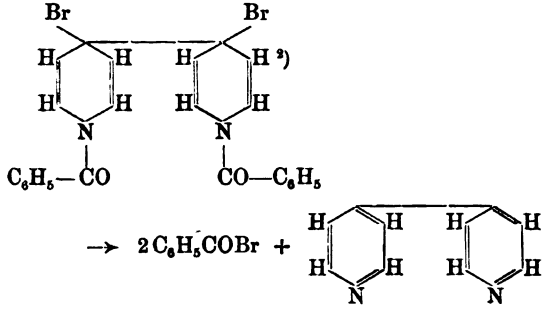
Das Auftreten des γ,γ'-Dipyridyls bei allen bisher gefundenen Zersetzungen könnte den *Verdacht* erwecken, daß das „*Benzoylpyridinium*" *selber schon ein γ,γ'-Dipyridylderivat* sei. Mit der Formulierung als N,N'-Dibenzoyltetrahydro-γ,γ'-dipyridyl $(C_{12}H_{10}ON)_2$ (Formel IX, s. o.) läßt sich aber, vom Molekulargewicht ganz abgesehen, weder die intensive Farbe noch die große Additionsfähigkeit vereinigen. Eher noch ließe sich eine *um zwei Atome Wasserstoff ärmere dimolekulare Formel* XI $(C_{12}H_9ON)_2$ diskutieren:



[1]) Knoevenagel u. Fuchs, Ber. d. d. chem. Ges. 35, 1788 (1902).

Digitized by Google

Ein solches Produkt könnte — so unwahrscheinlich dies ist — aus dem Pseudochlorid III durch Abspaltung von HCl statt Cl entstanden und müßte analog den γ-Benzyliden-N-alkyldihydropyridinen XII [1]) farbig und wohl auch recht reaktionsfähig sein. Besonders aber würde Formel XI die Bildung des Dipyridyls nach Addition von einem Molekül Halogen sehr glatt erklären:



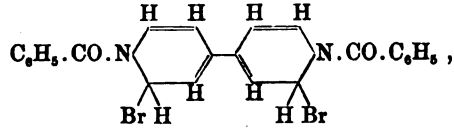
Die Analysen [3]) sprechen zwar mehr für den wasserstoffreicheren Körper, was aber nicht entscheidend sein kann. Ausschlaggebend ist das Resultat der Molekulargewichtsbestimmung. Ein Körper der Konstitution XI könnte selbst in der Hitze nicht in zwei Teilmoleküle — ohne tiefe Zersetzung — zerfallen. Es scheint also *keine Möglichkeit*, eine der beiden *dimolekularen Formeln* IX oder XI *aufrecht zu erhalten.*

Schließlich sei noch hingewiesen auf die dem Benzoylpyridiniumchlorid analogen Anlagerungsprodukte von

---

[1]) Vgl. Decker, Ber. d. d. chem. Ges. 38, 2494 (1905).

[2]) Oder

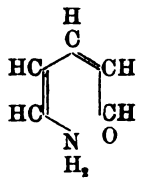


wenn das Brom in 1,6-Stellung addiert ist.

[3]) Ber. für $C_{13}H_{10}ON$: C 78,27 H 5,44
Ber. für $C_{13}H_9ON$: C 78,68 H 4,92
Gef. im Mittel: C 78,08 H 5,27

Digitized by Google

2,4-Dinitrochlorbenzol und von Bromcyan an Pyridin. Aus diesen Verbindungen entstehen sowohl durch Einwirkung von Alkalien wie von Aminen intensiv gefärbte Körper[1]), sogenannte *„Pyridinfarbstoffe"*, die nach den Untersuchungen von Zincke und seinen Mitarbeitern sowie von König wahrscheinlich Abkömmlinge eines durch Ringöffnung entstandenen ungesättigten Aldehyds



sind. Zu dieser Gruppe von Körpern kann das Reduktionsprodukt des Benzoylpyridiniumchlorids schon seiner Zusammensetzung nach nicht gehören; es ist auch viel ungesättigter als die Glieder dieser Körperklasse.

Versuchsteil.

Darstellung des Benzoylpyridiniums.

In einem weithalsigen Rundkolben von etwa 600 ccm Inhalt mit vierfach durchbohrtem Stopfen für Thermometer, Rührer, Chlorcalciumrohr und Zink-streuvorrichtung[2]) werden 80 ccm frisch destilliertes Benzoylchlorid und 80 ccm getrocknetes destilliertes Pyridin [„Pyridin I" von Kahlbaum] vermischt. Dann läßt man unter Kühlung mit Eis und andauerndem Rühren eine kleine Menge scharf getrockneten Zinkstaubs einfließen. Die Reaktion tritt erst nach einiger Zeit ein und macht sich durch starkes Steigen der Temperatur bemerkbar. Eventuell beschleunigt man ihr Eintreten, indem man die

[1]) Lit. siehe Lehrbuch Meyer-Jacobson II, 3, 785.

[2]) Diese besteht aus einem weiten, mit Zinkstaub gefüllten Rohr, in das ein unten breitgedrückter Glasstab durch einen Kork, verschiebbar, eingesetzt ist. Durch leises Senken des Glasstabes rieselt der Zinkstaub aus dem Rohr ab.

Digitized by Google

Masse vorübergehend Zimmertemperatur annehmen läßt. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß vor dem Eintreten der Reaktion nur sehr wenig Zink zugegeben ist, da sonst ihr Verlauf sehr stürmisch wird und die Masse überkocht. Die weitere Zugabe des Zinks — unter ständigem Rühren — wird so geregelt, daß die Temperatur der Mischung 40° nicht übersteigt. Nachdem etwa 30 g Zinkstaub eingetragen sind, wird das Ganze so dickflüssig, daß es sich nicht mehr rühren läßt; die Farbe ist schließlich bronzebraun.

Nun erhitzt man die Masse in dem Kolben zweimal mit je 250 ccm Äther 20—30 Minuten lang am Rückflußkühler, wobei unverändertes Pyridin und Benzoylchlorid in Lösung gehen, und kocht dann das Ungelöste mit 500 ccm Methylalkohol, worin sich alles bis auf einen schillernden braunen Körper und etwas Zinkstaub löst. Die dunkelbraune alkoholische Suspension wird noch warm vom Zinkstaub abdekantiert und filtriert; der auf der Filterplatte verbleibende bronzebraunglänzende Körper wird mit Alkohol und Äther gewaschen. Ausbeute 12—16 g. Aus dem Filtrat scheiden sich beim Erkalten große Mengen hellgelber Krystalle ab, eine Komplexverbindung von Pyridin mit Chlorzink.

Um den braunen Körper von anhaftendem Zink zu befreien, digeriert man ihn mehrmals mit kalter, verdünnter Salzsäure, bis mit Ferrocyankalium kein Niederschlag mehr entsteht; ganz zinkfrei wird er erst beim Umkrystallisieren. Er ist fast unlöslich in Ligroin und Petroläther, sehr schwer löslich in Alkohol, Äther, Aceton, Essigester, schwer in Tetrachlorkohlenstoff, Eisessig, Xylol, mäßig löslich in Phenetol, Benzoesäuremethyl- oder -äthylester, Chlor-, Brom- und Nitrobenzol, leichter in Chloroform (kalt $<1:100$), Äthylenbromid und Acetylentetrachlorid. Die hochsiedenden Mittel lösen in der Hitze (über 100°) viel leichter. Leicht löslich ist die Substanz in schmelzendem Phenol und Naphthalin. Die Farbe der Lösungen ist etwas ver-

Digitized by Google

schieden, sowohl im Ton — von Gelbbraun bis Rotbraun — als in der Intensität; besonders Lösungen in Nitrobenzol sind bei gleicher Konzentration viel dunkler als solche in anderen Lösungsmitteln. Zur *Reinigung* kann man *aus* siedendem *Benzoesäureester* umkrystallisieren (4 g auf 60 ccm) und erhält so dunkelbraune, fast metallisch glänzende Blättchen, die, mit Alkohol und Äther gewaschen, frei von Zink sind. Die Ausbeute beträgt höchstens 40 Proz. des Rohproduktes, mitunter ist sie noch erheblich kleiner.

Der große Verlust kommt einmal von der leichten Oxydierbarkeit besonders der heißen Lösungen des Benzoylpyridiniums durch den Luftsauerstoff unter Bildung farbloser, leicht löslicher Produkte (s. u.), andererseits aber auch von einer davon unabhängigen *Selbstzersetzung der erhitzten Lösungen*: denn auch im geschlossenen Rohr entfärbte sich die in Benzoesäureester gelöste Substanz manchmal (nicht immer) beim Erhitzen auf 180° unter Bildung eines geringen graugelben Niederschlages. Auch Äthylenbromid verhielt sich wechselnd; meist ließen sich die Lösungen längere Zeit ohne Veränderung kochen[1]), mitunter aber schieden sie schon nach relativ kurzem Erhitzen auf 130—140° gelbe Niederschläge ab und wurden heller braun. Aus eingeschmolzenen Chloroformlösungen fällt sogar oft schon nach mehrtägigem Verweilen bei Zimmertemperatur ein gelbes Produkt aus, ohne daß im übrigen Entfärbung eintritt. Lösungen in Nitrobenzol entfärben sich unter Luftabschluß schnell bei 170—180°, Phenollösungen bei 200°, beidemal ohne Bildung einer Abscheidung.

Bei allen diesen Zersetzungen ohne Luft handelt es sich wahrscheinlich um eine Disproportionierung in ein Oxydations-[2]) und ein Reduktionsprodukt, wie diese

[1]) Daher auch die Molekulargewichtsbestimmung in siedendem Äthylenbromid (s. u.).

[2]) Das Oxydationsprodukt Dipyridyl (s. u.) haben wir auch in den zersetzten Lösungen nachgewiesen.

Digitized by Google

z. B. bei den Radikalen mit zweiwertigem Stickstoff von Wieland[1]) beobachtet ist. Vielleicht wirken auch die Lösungsmittel bzw. geringe (saure?) Verunreinigungen derselben in einzelnen Fällen zersetzend. In möglichst indifferenten Mitteln erhielten wir nämlich selbst nach stundenlangem Erhitzen keine Veränderung, so z. B. in Chlorbenzol bei 130°, in Xylol bei 150°, in Naphthalin bei 180—200° und in Phenetol bei 200°.

Da *Phenetol* in der Hitze leicht löst, ist es recht geeignet zum *Umkrystallisieren*, wenn man im geschlossenen Gefäß arbeitet: Man überdeckt 0,4 g Rohprodukt in einem Reagensglas mit einem kleinen Wattebausch, gibt 10 ccm Phenetol zu, schmilzt das Rohr möglichst kurz über der Flüssigkeit ab und erhitzt es im Glycerinbad eine halbe Stunde in senkrechter Stellung auf 180°; dann dreht man das heiße Rohr um, wobei Zinkstaub und andere ungelöste Stoffe durch den Wattebausch[2]) zurückgehalten werden. Nach dem völligen Erkalten öffnet man das Rohr und wäscht die blättrigen braunen Krystalle auf der Filterplatte mit Alkohol und Äther. Ausbeute 0,2 g reine Substanz, die bei 229° unter Zersetzung schmilzt. Geringe Verunreinigung drückt den Zersetzungspunkt um 20—40° herunter. Die analysierten Proben I—III waren aus Benzoesäureester, IV aus Phenetol umkrystallisiert.

I. 0,1365 g gaben 0,3887 CO_2 und 0,0647 H_2O.
0,1354 g „ 9,2 ccm Stickgas bei 22° und 743 mm Druck.
II. 0,1171 g „ 0,3344 CO_2 und 0,0549 H_2O.
0,1258 g „ 8,8 ccm Stickgas bei 22° und 742 mm Druck.
III. 0,1183 g „ 0,3400 CO_2 und 0,0552 H_2O.
IV. 0,1117 g „ 0,3212 CO_2 und 0,0530 H_2O.

	Ber. für	Gef.			
	$C_{12}H_{10}ON$	I	II	III	IV
C	78,27	77,66	77,88	78,39	78,40
H	5,44	5,30	5,25	5,22	5,31
N	7,61	7,68	7,90	—	—

[1]) Diese Annalen 381, 202 (1911); 392, 129, 156 (1912).

[2]) Um diesen festzuhalten, ist das Rohr 1 cm über dem Boden etwas verjüngt.

Digitized by Google

In konz. Schwefelsäure löst sich das Benzoylpyridinium mit intensiv fuchsinroter Farbe; nach kurzer Zeit wird die Lösung hellgelb.

Molekulargewichtsbestimmungen.

I. Siedepunktserhöhung in Äthylenbromid.

Die Bestimmungen wurden in einer Kohlensäureatmosphäre vorgenommen; das Gas war durch eine glühende Kupferspirale von Sauerstoff befreit und mit Schwefelsäure getrocknet.

I. 0,0774 g gaben in 28,64 g $C_2H_4Br_2$ $\Delta = 0{,}106°$.
II. 0,0856 g „ „ 28,31 g $C_2H_4Br_2$ $\Delta = 0{,}135°$.

	Ber. für	Gef.	
	$C_{12}H_{10}ON$	I	II
Mol	184	164	144

II. Siedepunktserhöhung in Chlorbenzol.[1])

Die Kohlensäure wurde durch Chromchlorür von Sauerstoff befreit, und wurde durch ein besonderes, in das Siedegefäß eingeschmolzenes Glasrohr bis dicht über die Flüssigkeit geleitet.

0,0895 g gaben in 21,17 g C_6H_5Cl $\Delta = 0{,}110°$. Gef. Mol.: 165,3.

Nach der Bestimmung wurde durch Titration mit einer Lösung von Brom in Tetrachlorkohlenstoff festgestellt, daß die ganze angewandte Substanzmenge unzersetzt geblieben war:

Verbraucht zur Entfärbung 2,45 ccm 0,186 n-Bromlösung; ber. 2,50 ccm.

---

[1]) Über die molekulare Siedepunktskonstante für Chlorbenzol haben wir keine Angaben gefunden, sie mußte daher erst ermittelt werden.

0,1244 g Benzil in 22,44 g Chlorbenzol gaben $\Delta = 0{,}125°$. Gef.: $K = 4{,}68$.

Die Formel: $K = 0{,}02 \frac{T^2}{W}$ gibt $K = 4{,}27$.

(Nach Landolt-Börnstein, 4. Aufl. S. 842, ist $T = 131{,}6$; $W = 75{,}9$.)

Wir benutzten den Mittelwert: $K = 4{,}48$.

Digitized by Google

III. Gefrierpunktserniedrigung in Phenol.

1. Die Bestimmung wurde in einer Wasserstoffatmosphäre vorgenommen. Der Wasserstoff wurde über eine erhitzte Kupferspirale geleitet und mit Schwefelsäure getrocknet. Das mit magnetischem Rührer ausgestattete Gefriergefäß hatte zwei schräge seitliche Ansätze, einen zum Einleiten des Wasserstoffs, den anderen zum Ableiten desselben und zum Einfüllen der Substanz. Diese befand sich in Pillenform in einem als Wägeglas dienenden stumpfwinklig gebogenen Rohr, das durch einen Gummistopfen luftdicht, aber drehbar in dem Gasableitungsrohr befestigt war, und dessen Ende nicht zugeschmolzen, sondern nur kapillar (dickwandig) verengt war, so daß das Gas einen Ausgang hatte. Durch Drehen des Wägeglases um 180° kam dessen anfangs wagerechtes Ende in senkrechte Stellung, und die Substanz fiel in das Gefrierrohr.

Vor Beginn des Versuches wurde der mit Lösungsmittel und Substanz beschickte Apparat mehrmals vom Wägeglas her evakuiert und mit Wasserstoff nachgespült. Während der Bestimmung stand er fortwährend unter dem Druck des Kippschen Apparats. Bei gleicher Beschickung wurde eine große Reihe von Gefrierpunktsbestimmungen gemacht, um die zeitliche Änderung zu studieren. Das Maximum stellte sich jeweils schnell ein. Ob beim Auftauen des erstarrten Phenols mehr oder weniger hoch erhitzt wurde — von 50 bis auf 100° —, machte nichts aus:

Angewandt 0,1089 g Substanz in 28,27 g Phenol.

Nr.	Δ	Nr.	Δ	Nr.	Δ
1	0,045	12	0,111	23	0,132
2	0,058	13	0,124	24	0,133
3	0,078	14	0,125	25	0,137
4	0,085	15	0,117	26	0,134
5	0,091	16	0,116	27	0,135
6	0,093	17	0,128	28	0,137
7	0,098	18	0,131	29	0,138
8	0,098	19	0,138	30	0,136
9	0,098	20	0,139	31	0,145
10	0,111	21	0,136	32	0,138
11	0,110	22	0,133	33	0,172

Digitized by Google

Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bestimmungen verging im allgemeinen $^1/_4$ Stunde, nur Nr. 20 und 21 lagen 17 Stunden auseinander. Die Werte der Bestimmungen 19—30 sind innerhalb der Fehlergrenze konstant, im Mittel ist $\Delta = 0{,}136^0$; daraus ergibt sich das Molekulargewicht 204 (ber. 184 für $C_{12}H_{10}ON$).

2. Der Wasserstoff wurde mit Chromchlorür und mit alkalischer Bleilösung gewaschen. Außerdem wurde während des Evakuierens der Apparatur das Phenol geschmolzen gehalten, um Reste gelöster Luft zu vertreiben. Sonstige Ausführung wie bei 1.

Angewandt 0,0967 g Substanz in 23,59 g Phenol.

Nr.	Δ	Nr.	Δ	Nr.	Δ
1	0,093	6	0,089	11	0,098
2	0,093	7	0,090	12	0,102
3	0,098	8	0,093	13	0,160
4	0,098	9	0,105	14	0,317
5	0,080	10	0,095		

Die Gefrierpunktsdepression blieb hier also bei den 12 hintereinander — etwa im Laufe von 3 Stunden — ausgeführten Ablesungen ziemlich konstant. Der Mittelwert, $\Delta = 0{,}090^0$ führt zu dem Molekulargewicht 328; ber. 368 für $(C_{12}H_{10}ON)_2$. Nach dem Einlassen von trockner Luft, bei Nr. 13, sank der Gefrierpunkt schnell und stetig, um erst nach völliger Entfärbung der Lösung konstant zu bleiben. Die Depression betrug dann $0{,}317^0$, entsprechend einem scheinbaren Mol.-Gew. 97.

IV. Gefrierpunktserniedrigung in Naphthalin.

Die Bestimmung wurde unter denselben Vorsichtsmaßregeln wie Bestimmung III, 1 ausgeführt.

0,0738 g gaben in 26,70 g Naphthalin $\Delta = 0{,}060^0$.

	Ber. für $(C_{12}H_{10}ON)_2$	Gef.
Mol.	368	319

Frühere Bestimmungen der Gefrierpunktserniedrigung in *Nitrobenzol* gaben sehr schwankende, manchmal fast verschwindend kleine Depressionen. Ob diesen Werten etwas Tatsächliches zugrunde liegt, ist fraglich.

Digitized by Google

Oxydation an der Luft.

1. Verlauf der Oxydation.

Die durch kurzes Schütteln im Reagensglas frisch bereiteten, filtrierten Lösungen des Benzoylpyridiniums in Chloroform, Benzoesäureester, Pyridin, Phenetol u. a. entfärben sich, wenn man sie in kleinen Schälchen der Luft aussetzt, meist innerhalb 5—15 Minuten. Ein Tropfen der Benzoesäureesterlösung, auf Filtrierpapier gebracht, braucht zur Entfärbung nur wenige Minuten; die Chloroformlösungen dunsten dabei meist ein, bevor alles oxydiert ist. Kalt bereitete Lösungen in Äthylenbromid brauchen mehrere Stunden; in geschmolzenem Phenol hingegen erfolgt die Entfärbung selbst konz. Lösungen sehr schnell. Sonst erfordert die Oxydation konz. Lösungen, sowie größerer Mengen im allgemeinen entsprechend längere Zeit. Durch Erhitzen wird die Geschwindigkeit der Oxydation stark erhöht, und besonders scheinen in Lösungen, die einmal ohne Luftabschluß erhitzt und deswegen stark anoxydiert sind, die Zersetzungsprodukte katalytisch zu beschleunigen.[1]) Da außerdem kleine Verunreinigungen der Lösungsmittel einen großen Einfluß zu haben scheinen, müssen wir trotz vieler Versuche vorläufig darauf verzichten, exakte Angaben über die Oxydationsgeschwindigkeit zu machen.

Ganz besonders große Verschiedenheiten haben wir in Nitrobenzol gefunden: kalt (wie oben) bereitete Lösungen sind hier sehr beständig und entfärben sich u. U. erst nach einigen Tagen; Lösungen, die einmal ohne Luftabschluß im offenen Reagensglas erhitzt waren, sich dann aber in zugeschmolzenen Röhren noch monatelang

[1]) Ein Superoxyd wurde jedoch nie gefunden. Charakteristisch ist auch, daß in zwei jahrelang aufbewahrten festen Proben sich einzelne Partien vollständig entfärbt hatten, während andere — in dem ursprünglich ganz einheitlichen Präparat — noch unzersetzt schienen.

Digitized by Google

unverändert hielten, wurden an der Luft innerhalb weniger Minuten entfärbt. War dagegen auch das Erhitzen im zugeschmolzenen Rohr (CO_2-Atmosphäre) vorgenommen, so oxydierten sich die Lösungen hernach an der Luft nicht viel schneller als die nicht erhitzten. Eine Veränderung durch das Nitrobenzol selbst ist wenigstens bei Temperaturen um 100° nicht erfolgt; denn die aus den heiß gesättigten, bis 10 Stunden lang erhitzten Lösungen ausgefallenen Krystalle zeigten noch den richtigen Schmelzpunkt, waren sogar besonders schön ausgebildet: längliche sechs- (selten vier-) seitige Blättchen.

2. Verbrauch von Sauerstoff.

Da Versuche mit anderen Lösungsmitteln und in Gefäßen mit Gummi-Stopfen oder -Verbindungen nicht zum Ziele geführt hatten, verfuhren wir wie folgt: In einen Fraktionierkolben von etwa 200 ccm Inhalt, dessen Ansatzrohr U-förmig (manometerartig) umgebogen war, gaben wir 20 ccm Phenol und, nachdem dies erstarrt war, ein Röhrchen mit 0,1957 g Benzoylpyridinium. Nun wurde der Hals des Kolbens zugeschmolzen, nach Ausgleich der Temperatur das Manometerrohr mit Quecksilber gefüllt und der Druck abgelesen. Durch Erwärmen wurde hierauf das Phenol geschmolzen, die Substanz gelöst und durch Schütteln mit der eingeschlossenen Luft oxydiert. Nach dem Erkalten wurde das Manometer wieder abgelesen. Der Gasdruck (Atmosphärendruck + Quecksilbersäule) betrug:

vor der Oxydation: 778,5 mm bei 14°, d. i. 740,6 mm bei 0°;
nach der Oxydation: 748,3 mm bei 13,5°, d. i. 713,1 mm bei 0°.

Der Gasraum im Kolben (nach Abzug des Volumens für Phenol usw.) wurde durch Auswägen mit Wasser zu 186 ccm bestimmt. Also verbraucht:

186 ccm Sauerstoff von 27,5 mm und 0° = 6,28 ccm von 760 mm und 0°; d. i. auf 1 Mol (184 g) 5,91 Liter statt der für $^1/_2$ *Atom Sauerstoff* berechneten 5,6 Liter.

Digitized by Google

3. Die Produkte der Oxydation.

a) *Einfach und zweifach benzoesaures γ,γ'-Dipyridyl*: 1 g Benzoylpyridinium wird, in 200 ccm Chloroform gelöst, unter gelindem Erwärmen und häufigem Umschütteln auf dem Wasserbade im offenen Kolben oxydiert; schließlich wird die fast farblose Lösung eingedampft, der letzte Rest des Chloroforms abgedunstet, und die zurückbleibende Krystallmasse zur Entfernung von etwas braunem Öl[1]) auf Ton getrocknet. Rohausbeute etwa 0,9 g. Durch Umkrystallisieren aus 100 ccm siedenden Petroläthers (Siedep. 60—80°) erhält man farblose, bunt schillernde Blättchen, 0,6 g, vom Schmelzp. 108°. Die Mutterlauge davon gibt beim Abdampfen Nadeln, die, aus Wasser krystallisiert, bei 120—121° schmelzen und sich als *Benzoesäure* erweisen. Die Blättchen vom Schmelzp. 108° lösen sich kaum in verdünnten Säuren, dagegen leicht in fast allen organischen Lösungsmitteln. Zur Analyse wurden sie nochmals aus Petroläther umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt blieb konstant.

0,1446 g gaben 0,3866 CO_2 und 0,0687 H_2O.
0,1056 g „ 0,2825 CO_2 „ 0,0514 H_2O.
0,1067 g „ 9,6 ccm Stickgas bei 18,9° und 743 mm Druck.
0,1870 g „ 11,9 ccm „ „ 21,5° „ 756 mm „
0,1681 g „ in 15,57 Aceton Siedepunktserhöhung 0,128°.
0,1910 g „ „ 17,23 „ „ 0,122°.

Ber. für $C_{17}H_{14}N_2O_2 = C_{10}H_8N_2 . C_7H_6O_2$			Gef.
C	73,35	72,92	72,96
H	5,07	5,31	5,44
N	10,07	10,28	10,01
Mol	278	140,9	152

Dieselbe Substanz entsteht, wenn man das nachher beschriebene γ,γ'-Dipyridyl mit Benzoesäure (1:1 Mol.) aus wenig Wasser zusammen krystallisieren läßt; es liegt

[1]) Durch Geruch und Überführung in Benzamid kann man darin die Anwesenheit von Benzoesäureester nachweisen, der sich aus der Benzoesäure und dem im Chloroform enthaltenen Alkohol gebildet hat.

Digitized by Google

also *einfach benzoesaures γ,γ'-Dipyridyl* vor. Das niedrige Molekulargewicht deutet auf einen völligen Zerfall des gelösten Salzes in seine Komponenten.

Krystallisiert man das rohe Oxydationsprodukt aus Wasser um — statt aus Petroläther —, so erhält man ebenfalls farblose Blättchen, die jedoch erst bei 116° schmelzen.

0,0662 g gaben 0,1751 CO_2 und 0,0323 H_2O.
0,0646 g „ 4,0 ccm Stickgas bei 18,5° und 764 mm Druck.

Ber. für $C_{24}H_{20}O_4N_2 = C_{10}H_8N_2.2C_7H_6O_2$		Gef.
C	72,00	72,11
H	5,00	5,45
N	7,00	7,12

Die Analyse deutet auf ein *zweifach benzoesaures Dipyridyl.* Tatsächlich kann man die gleiche Verbindung auch erhalten durch Zusammenkrystallisieren des vorhin beschriebenen einfach benzoesauren Salzes mit einem Molekül Benzoesäure aus Wasser.

b) *Das freie γ,γ'-Dipyridyl.* Die in der Hitze bereitete Lösung von 1 g benzoesaurem Dipyridyl (Schmelzpunkt 108°) in 15 ccm stark verdünnter Alkalilauge scheidet beim Abkühlen lange, feine, silberglänzende Nadeln ab; Ausbeute gegen 0,6 g. Die Mutterlauge davon gibt mit Salzsäure einen farblosen krystallinischen Niederschlag, der sich in üblicher Weise als Benzoesäure erkennen läßt.

Die aus der alkalischen Lösung ausgefallenen „Nadeln" sind leicht löslich in verdünnten Säuren und in organischen Lösungsmitteln. Durch Umkrystallisieren aus wenig heißem Wasser erhält man seideglänzende Nadeln; diese schmelzen bei 73°, werden im Vakuum über Schwefelsäure unter Wasserverlust matt und schmelzen dann erst bei 111—112°. Das scharf getrocknete Produkt wurde analysiert:

0,0825 g gaben 0,2326 CO_2 und 0,0498 H_2O.
0,1369 g „ 0,3686 CO_2 „ 0,0666 H_2O.
0,0807 g „ 12,4 ccm Stickgas bei 21,5° und 758 mm Druck.

Digitized by Google

	Ber. für $C_{10}H_8N_2$	Gef.	
C	76,91	76,92	76,95
H	5,17	5,36	5,44
N	17,95	17,76	—

Die Analyse spricht für ein Dipyridyl. Für γ,γ'-Dipyridyl ist in wasserfreiem Zustande der Schmelzpunkt 112° angegeben, alle anderen Dipyridyle schmelzen tiefer. Auch die Reaktion der salzsauren Lösung mit Ferrocyankalium[1]) — Eintreten einer farblosen Fällung, die schnell schmutzig indigoblau wird und sich in viel Wasser mit roter Farbe wieder auflöst — deutet darauf, daß unser Dipyridyl die γ,γ'-Verbindung ist.

Zur einwandfreien Konstitutionsermittlung wurde schließlich das Dipyridyl noch *zur Pyridincarbonsäure oxydiert*[2]): 2 g der Base wurden in 200 ccm Wasser mit 8 g $KMnO_4$ 5 Stunden lang (bis zur Entfärbung) gekocht, die vom Braunstein abfiltrierte Lösung mit der dem Kali äquivalenten Menge Schwefelsäure versetzt und eingedampft. Der Trockenrückstand wurde mehrmals, erst mit kaltem, dann mit heißem Alkohol ausgezogen, und die zur Trockne gedampften alkoholischen Auszüge einzeln weiter behandelt. Sie waren alle in kaltem Wasser schwer löslich, die wäßrigen Lösungen gaben sämtlich mit Kupferacetat hell grünblaue Niederschläge. Pyridin-α-carbonsäure war also nirgends vorhanden. Durch Zersetzung der Kupfersalze mit Schwefelwasserstoff wurden insgesamt 0,8 g bräunlichgelbe Säure erhalten, die durch Sublimieren gereinigt wurde. Das so gewonnene farblose Produkt schmolz im geschlossenen Rohr bei 310°, im offenen sublimierte es, ohne zu schmelzen. Dadurch, sowie durch die Analyse ist das Vorliegen von *Pyridin-γ-carbonsäure* erwiesen:

0,0959 g gaben 0,1978 CO_2 und 0,0374 H_2O.

	Ber. für $C_6H_5O_2N$	Gef.
C	55,88	56,28
H	4,09	4,36

[1]) Anderson, diese Annalen **154**, 275 (1870).

[2]) Nach Weidel u. Russo, Monatsh. **3**, 864 (1882).

Digitized by Google

Pyridin-β-carbonsäure, für die wir ein Vergleichspräparat aus Nikotin hergestellt hatten, konnte nirgends nachgewiesen werden. Also kann das der Oxydation mit $KMnO_4$ unterworfene Dipyridyl tatsächlich nur die γ,γ'-Verbindung gewesen sein.

Behandelt man das *γ,γ'-Dipyridyl in schwach salzsaurer Lösung mit Zinkstaub*, so tritt eine intensive Violettfärbung ein, die — nach dem Abfiltrieren vom Metall — beim Schütteln mit Luft sofort verschwindet. Ebenso verschwindet die Färbung durch Zusatz von mehr Säure und tritt darum bei der Reduktion des Dipyridyls in stärker saurer Lösung überhaupt nicht ein. Das obengenannte benzoesaure Salz gibt in salzsaurer Lösung dieselben Erscheinungen, desgleichen γ,γ'-Dipyridyl, das wir aus Pyridin–Natrium bereiteten[1]) (nur als Rohprodukt untersucht). — Worauf die eigenartige Farbenreaktion beruht, muß erst durch weitere Versuche festgestellt werden.

Die Oxydation des Benzoylpyridiniums durch Luftsauerstoff führt in anderen Lösungsmitteln zu denselben Produkten wie in Chloroform. Zu deren Isolierung braucht man die entfärbten Lösungen, falls sie mit Wasser nicht mischbar sind, nicht einzudampfen, sondern kann ihnen einfach zunächst durch Schütteln mit Natronlauge die Benzoesäure, dann mit verdünnter Säure das Dipyridyl entziehen.

Auch aus den schon erwähnten Proben festen Benzoylpyridiniums, die sich im Laufe der Jahre größtenteils in farblose Krystalle (Pseudomorphosen?) verwandelt hatten, wurde nur benzoesaures Dipyridyl und freie Benzoesäure isoliert. Etwa ein Fünftel des Benzoylpyridiniums war noch unverändert und wegen seiner Schwerlöslichkeit leicht abzutrennen.

Verhalten gegen Halogen.

Fügt man zu dem in Äthylenbromid oder Acetylentetrachlorid gelösten Benzoylpyridinium tropfenweise eine Auflösung von Chlor oder Brom in Tetrachlorkohlenstoff,

[1]) Nach Anderson, diese Annalen 154, 273, 274 (1870).

Digitized by Google

so färbt sich die Lösung zunächst noch etwas dunkler braun, wird dann heller und schließlich farblos; bald scheidet sich ein weißer bzw. hellgelber Niederschlag aus, und es tritt deutlich der Geruch nach Benzoylchlorid auf. Der abfiltrierte und mit Tetrachlorkohlenstoff gewaschene Niederschlag löst sich leicht in Wasser und Alkohol; seine wäßrige Lösung gibt mit halogenfreier Natronlauge einen Niederschlag von langen schmutzigweißen Krystallnadeln, die, in Salzsäure leicht löslich, sich aus heißem Wasser leicht umkrystallisieren lassen. Die gereinigte Substanz schmilzt bei 71—72°, nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator — wobei sie trüb wird — bei 111—112°, gibt mit Zink und Salzsäure die gegen Luft empfindliche Violettfärbung und erweist sich auch durch die Analyse als identisch mit dem durch die Luftoxydation erhaltenen *γ,γ'-Dipyridyl.*

0,1042 g gaben 0,2937 CO_2 und 0,0504 H_2O.
0,1313 g „ 20,4 ccm Stickgas bei 19° und 748 mm Druck.
0,0626 g „ in 12,95 Aceton Siedepunktserhöhung 0,055°.

	Ber. für $C_{10}H_8N_2$	Gef.
C	76,91	77,02
H	5,17	5,34
N	17,95	17,79
Mol	156	149

Das wäßrig-alkalische Filtrat vom Dipyridyl gibt mit Silbernitrat eine Fällung von Halogensilber. Die in einem Falle ausgeführte rohe quantitative Bestimmung ergab, daß auf 1 Molekül Dipyridyl 2 Atome Brom vorlagen; der Niederschlag besteht also aus dem Dichlor- bzw. -bromhydrat des Dipyridyls.

Jod in Chloroformlösung scheint ähnlich zu wirken. Die Einwirkung von Chlor und Brom verläuft so glatt und leicht erkennbar, daß man das Benzoylpyridinium bequem *mit einer Halogenlösung* von bekanntem Gehalt auf Farblos *titrieren* kann. Dabei wird auf *1 Mol Benzoylpyridinium 1 Atom Halogen* verbraucht, z. B.:

0,1885 g, in Acetylentetrachlorid gelöst, verbrauchten 5,28 ccm 0,186 n-Bromlösung, d. i. auf 1 Mol 79 g Brom (statt 80).

Digitized by Google

Einwirkung von Eisessig–Salzsäure.

In einem mit Tropftrichter versehenen und mit luftfreiem Wasserstoff gefüllten Fraktionierkolben löst man unter Erwärmen 0,5 g Benzoylpyridinium in 160 ccm Eisessig und läßt dann durch den Tropftrichter 25 ccm mit Chlorwasserstoff gesättigten Eisessig zufließen. Die Lösung wird zunächst etwas dunkler und entfärbt sich bald darauf vollständig. Nun wird der Eisessig im Vakuum abdestilliert, und der fast farblose Rückstand mit wenig Wasser ausgezogen. Ungelöst bleibt Benzoesäure, in der üblichen Weise identifiziert. Die wäßrige Lösung scheidet auf Zusatz von Alkali ein Gemisch von farblosen Krystallen und einem hellbraunen amorphen Körper aus. Das abgesaugte und getrocknete Gemisch wird mit etwa 15 ccm Äther ausgezogen, worin sich die Krystalle lösen. Die mit Ätzkali getrocknete ätherische Lösung hinterläßt beim Eindampfen nadelförmige Krystalle, die, aus Wasser umkrystallisiert, sich in allen Eigenschaften als das mehrfach angetroffene *γ,γ'-Dipyridyl* erweisen.

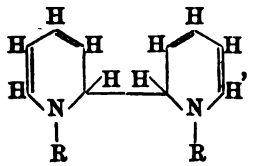
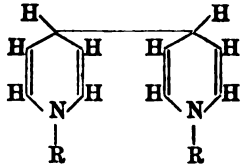
Das in Äther schwer lösliche, amorphe Produkt ist löslich in verdünnter Salzsäure und daraus durch Alkali wieder fällbar, es gibt mit Zinkstaub und wenig Salzsäure die γ,γ'-Dipyridylreaktion nicht. Durch Lösen in heißem Alkohol und teilweises Abdunsten des letzteren kann es in undeutlichen Krystallen erhalten werden, die bei 218—220° schmelzen. Die genaue Untersuchung steht noch aus.

Digitized by Google

II. Das Benzylpyridinium;

von *Ernst Weitz* und *Annemarie Nelken*
(mitbearbeitet von Hrn. *R. Ludwig*).
(Aus dem Chemischen Institut der Universität Münster.)

Nachdem wir im Benzoylpyridinium ein vom Pyridin abgeleitetes freies Ammoniumradikal gefunden hatten, haben wir unser Augenmerk auf die Produkte gerichtet, die A. W. Hofmann[1]) im Jahre 1881 aus Methyl-, Äthyl- und Benzylpyridiniumhalogeniden durch Reduktion mit Na-Amalgam erhalten und als *N,N'-Dialkyltetrahydro-α,α'-dipyridyle* (I) angesprochen hatte, und die in jüngster Zeit von Bruno Emmert[2]) als Abkömmlinge des *γ,γ'-Dipyridyls* (II) formuliert worden waren.

I  II 

Diese Verbindungen haben nämlich *dieselbe Zusammensetzung wie die* den Halogeniden entsprechenden *Alkyl- bzw. Arylpyridiniumradikale*, sind jedoch im Gegensatz zu unserem Benzoylpyridinium farblos. Von der Benzylverbindung macht A. W. Hofmann jedoch (a. a. O. S. 1504) die wichtige Angabe, sie löse sich *in heißem Alkohol mit tiefbrauner Farbe*, um sich *beim Erkalten wieder* ziemlich *farblos* abzusetzen. Hier schien also der beim Benzoylpyridinium nicht realisierbare Fall vorzuliegen, daß tatsächlich eine farblose, wohl dimolekulare, und eine farbige, monomolekulare Form existiert, analog N_2O_4 und NO_2.

A. W. Hofmann nimmt das rohe *Reduktionsprodukt* des Benzylpyridiniumchlorids *in Äther* auf und erhält

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. **14**, 1503 (1881).
[2]) Ber. d. d. chem. Ges. **52**, 1351 (1919).

Digitized by Google

durch Zugabe von absolutem Alkohol sein farbloses Dipyridylderivat. Als wir für die Fällung *Methyl- statt Äthylalkohol* verwendeten, trat nach einiger Zeit eine schöne *indigoblaue Färbung* der Lösung auf. Schüttelte man diese Lösung *im offenen Reagensglase*, so *verschwand die Farbe* wieder, um nach kurzer Zeit *neu zu erscheinen* — ein Spiel, das sich noch oft wiederholen ließ. Im zugeschmolzenen Reagensglase hingegen verschwand — nach anfänglicher Entfärbung — die Farbe nicht mehr, sondern vertiefte sich bis zu einem undurchsichtigen Schwarzblau, ähnlich einer blau fließenden Tinte. Beim Öffnen des Glases trat schnell Entfärbung[1]) ein. Offenbar hatten wir hier — schneller als wir erwarteten — das vor uns, was wir suchten: die blaue Lösung enthielt das *durch Dissoziation* nach und nach entstehende freie *Radikal* und war darum sehr oxydierbar. Wie durch Sauerstoff, so wird die blaue Lösung auch durch *Halogene* sofort entfärbt unter *Rückbildung von Benzylpyridiniumsalz*, das wir als Hexanitrokobaltiat identifizieren konnten. Mit Äthyl- (statt Methyl-) Alkohol traten die Erscheinungen kaum ein, erst beim Erhitzen erhielten wir eine viel schwächere Blaufärbung.

Inzwischen hatte auch Emmert[2]) gefunden, daß das farblose, feste Dibenzyltetrahydrodipyridyl sich beim Erhitzen seiner alkoholischen Lösung blau färbt, die Oxydierbarkeit dieser blauen Lösungen, sowie ihre Reaktion mit Halogen festgestellt und die gleichen Schlüsse wie wir gezogen.

Unsere Beobachtungen sind aber noch weiter gegangen:

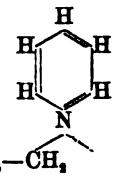
---

[1]) Die Lösung wird nicht farblos, sondern gelblich und später immer stärker braungelb. Unter „Entfärbung" soll daher hier und ebenso im folgenden immer nur das Verschwinden der blauen Farbe verstanden sein.

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. 53, 370 (1920). Über das krystallisierte Benzylpyridinium (und die Benzoylverbindung) habe ich am 10. März 1920 im chemischen Kolloquium zu Münster i. W. vorgetragen, sowie am 22. September auf der Naturforscherversammlung in Nauheim. E. W.

Digitized by Google

In den zugeschmolzenen Röhren scheiden sich manchmal aus den tiefblauen Lösungen *dunkelrote*, zackige *Krystalle* ab, die sich an der Luft sofort oberflächlich schwarz färben, höher schmelzen als der Hofmannsche Körper und zum Unterschied von ihm in Äther fast unlöslich sind. *In Alkohol* sind die roten Krystalle löslich, die *Lösungen* sind *sofort kräftig blau* und zeigen alle Eigenschaften der oben erwähnten, aus farblosen durch nachträgliche Umwandlung — Dissoziation — entstandenen blauen Lösungen. Die Analyse des — unter sorgfältigem Luftabschluß isolierten — neuen Körpers zeigt (soweit die Genauigkeit einer Verbrennung dies zuläßt), daß er dieselbe Zusammensetzung wie seine ungefärbte Muttersubstanz hat. Wenn jene blauen Lösungen das freie Radikal

III 

Benzylpyridinium (III) enthalten, so liegt es also hier *in isolierter Form* vor.

Das Benzylpyridinium wird in alkoholischer Lösung *durch wäßrige Säure* ebenso schnell *entfärbt* wie durch Oxydationsmittel (Luft oder Halogen), wahrscheinlich unter Bildung eines Reduktionsproduktes neben Pyridiniumsalz. Es ist offenbar viel elektropositiver, metallähnlicher als das Benzoylpyridinium; daher führt ja auch die Einwirkung der Halogene zum richtigen Pyridiniumsalz und nicht, wie dort, zu einem Ausweichprodukt.

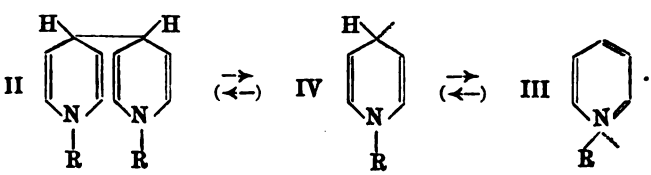
Eine Molekulargewichtsbestimmung des Benzylpyridiniums haben wir bisher noch nicht ausführen können[1]), einmal wegen seiner außerordentlichen Luft-

[1]) Anm. bei d. Korr.: Inzwischen scheint es Herrn R. Ludwig gelungen zu sein, in Eisessig das *einfache* Molgew. $C_{12}H_{12}N$ für das Benzylpyridinium festzustellen. Nähere Mitteilung darüber erfolgt später. E. W.

Digitized by Google

empfindlichkeit und überhaupt großen Zersetzlichkeit, außerdem wegen der Schwierigkeit, ein passendes Lösungsmittel dafür zu finden. Die Auffassung der roten Krystalle als monomolekulares Pyridinium stützt sich im wesentlichen auf die intensive Farbe und die Entstehung aus dem farblosen Dipyridylderivat, sowie die große Luftempfindlichkeit, alles Dinge, die durchaus der Bildung des farbigen, oxydablen Triphenylmethyls aus dem farblosen, luftbeständigen Hexaphenyläthan analog erscheinen. Allerdings war auch für das *farblose Dibenzyltetrahydrodipyridyl* in der Literatur keine *Molekulargewichtsbestimmung* zu finden, und es ist uns erst nach längeren Mißerfolgen gelungen, wenigstens in *siedendem Aceton* das einem Dimeren entsprechende Molekulargewicht zu finden, in Benzol hingegen waren die Werte sowohl der Siedepunktserhöhung wie der Gefrierpunktserniedrigung hartnäckig niedriger, meist $^3/_4$ des erwarteten, obwohl keine Anzeichen einer Dissoziation vorhanden waren.

Ob man im übrigen dem A. W. Hofmannschen *Reduktionsprodukt des Benzylpyridiniumchlorids* tatsächlich die *Konstitution* (II) eines α,α'- bzw. γ,γ'-Dipyridylderivates zuerteilen darf, ist vielleicht noch fraglich. Nach Emmert bildet sich aus diesem durch Dissoziation zunächst eine Verbindung IV mit dreiwertigem Kohlenstoff, die sich dann nachträglich zum Pyridinium (III) umlagert, eine Umkehrung der Vorgänge, die sich bei der Reduktion des Benzylpyridiniumchlorids abspielen sollen:

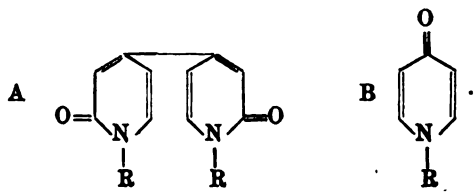


Daß in den gelben ätherischen Lösungen der farblosen Verbindung II das primäre methylartige Spalt-

Digitized by Google

produkt IV vorhanden ist, wie Emmert[1]) für denkbar hält, scheint uns ausgeschlossen; denn das ganz reine, farblose Produkt löst sich so gut wie farblos in Äther, und diese Lösung wird erst allmählich an der Luft, wohl durch Oxydation, gelb bis braun. Eine besondere, etwa an Triphenylmethyl erinnernde Oxydierbarkeit der braungelben Lösungen haben wir aber nie beobachtet, vielmehr geben sie beim Abdunsten an der Luft eine reichliche Krystallisation der unveränderten Tetrahydrodipyridylverbindung neben braunem Harz.

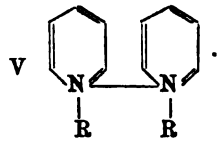
Aber von der Bildung eines eventuell nicht faßbaren Zwischenproduktes der Dissoziation ganz abgesehen, scheint es uns überhaupt merkwürdig, daß eine C—C-Bindung, die in keiner Weise mit aromatischen Resten „überlastet" ist, sich so leicht lösen soll. Man müßte denn schon die treibende Kraft in einer Neigung der Dihydropyridinringe zum Übergang in echte Pyridinringe suchen, welcher wegen des am Stickstoff haftenden Aryls ja durch Oxydation hier nicht möglich ist. Da aber die bei der Hantzschschen Pyridinsynthese entstehenden Dihydropyridine ganz beständige Körper sind, kann diese Annahme nicht stichhaltig sein. Als Beweis für die lockere Verknüpfung der beiden Pyridinkerne wird die schon von A. W. Hofmann ausgeführte Rückoxydation der Dialkyltetrahydrodipyridyle zu den quaternären Pyridiniumbasen (mittels $AgNO_3$) angeführt. Gerade dieser Verlauf der Oxydation ist jedoch sehr verdächtig; denn man sollte erwarten, daß dabei entweder ein zweikerniges o-Pyridon (A) entsteht, oder, wenn die beiden Kerne getrennt werden, ein einfaches γ-Pyridon (B).



[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 53, 372 (1920).

Digitized by Google

Wir halten es darum für wahrscheinlicher, daß in dem farblosen Produkt die beiden Pyridinringe überhaupt nicht durch Kohlenstoff, sondern *durch Stickstoff verknüpft* sind, daß ihm also die Konstitution eines „Diammoniums“ (V) zukommt:

V 

Dies entspräche dann bis zu einem gewissen Grade dem farblosen N_2O_4, das auch durch Dissoziation in das stark gefärbte NO_2 übergeht.[1]) Bemerkenswert ist ferner folgende Farbanalogie: einfache Nitrosoverbindungen sind blau, dimolekulare farblos; einfache Verbindungen mit zweiwertigem Stickstoff grün oder blau[2]), die dimolekularen Hydrazine bzw. Tetrazane farblos.

Für *das freie Radikal* selbst scheint ein Zweifel an der *Pyridiniumformel* III, etwa zugunsten der *„Methyl“-Formel* IV nach den oben angestellten Erörterungen kaum am Platze. Nun hat aber Cone[3]) durch *Reduktion*

---

[1]) N_2O_4 wird zwar meist nicht als formuliert, sondern als gemischtes Anhydrid O=N—O—N , hauptsächlich wegen seines Verhaltens gegen Wasser. Aber die Bildung von $HNO_2 + HNO_3$ wird ebensogut durch die erste Formulierung erklärt; denn auch sonst reagieren Nichtmetalle (oder Verbindungen von solchen) mit Wasser, noch allgemeiner mit Alkali, unter Bildung der entsprechenden H- und OH-Verbindung, z. B.

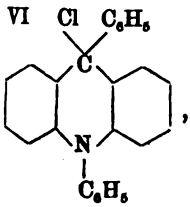
$$Cl_2 + H_2O \rightarrow HCl + HOCl$$
$$NC—CN + H_2O \rightarrow HCN + HOCN.$$

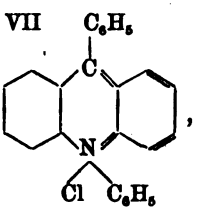
[2]) Wieland, diese Annalen **381**, 206 (1911); Ber. d. d. chem. Ges. **45**, 2601 (1912). St. Goldschmidt, ebenda **53**, 44 (1920).

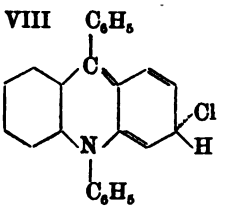
[3]) Journ. Amer. chem. Soc. **36**, 2101 (1914); Zentralbl. **1915**, I, 791.

Digitized by Google

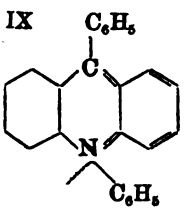
des aus 9-Oxy-9,10-diphenylacridan (Formel analog VI) entstehenden Chlorids oder Sulfats (*„Diphenylacridiniumsalz“* VII) mittelst Zinkstaubs (oder Kupfer oder Silber)

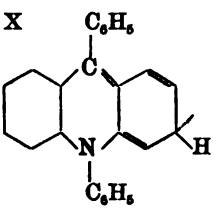
VI 

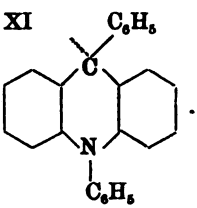
VII 

VIII 

ein Radikal erhalten, das er *nicht* als freies *„Acridinium“* (IX) mit vierwertigem Stickstoff, sondern in Anlehnung an die chinoide Formel des Triphenylmethyls als chinoides *„Diphenylacridyl“* (X) *mit dreiwertigem Kohlenstoff* auffaßt, das mit einer benzoiden Methylform (XI) im Gleichgewicht steht.[1])

IX 

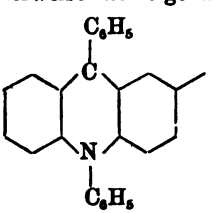
X 

XI 

Es erhebt sich daher die Frage, ob nicht ebenso auch unser Pyridinium als „Methyl“ (Formel IV) zu formulieren ist.[2])

---

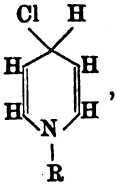
[1]) Sowohl im Original wie im Zentralblattreferat steht an Stelle von Formel XI irrtümlicherweise die folgende:



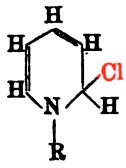
[2]) Hr. Prof. Meisenheimer hat mich nach meinem Nauheimer Vortrag (brieflich) auf die Analogie des Diphenylacridyls mit dem Benzylpyridinium hingewiesen. E. W.

Digitized by Google

Wir glauben diese Frage aus folgenden Gründen verneinen zu müssen: Während für die Salze des Diphenylacridols wegen ihrer gelben Farbe und überhaupt der nahen strukturellen Beziehung zum Triphenylcarbinol statt der Acridinium- (VII) die Chinocarboniumformel (VIII) nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen ist, scheint doch *kaum eine Veranlassung* vorzuliegen, auch die *Alkyl- oder Arylpyridiniumchloride* nicht als Ammoniumsalze, sondern *als Pseudochloride* mit dreiwertigem Stickstoff (XII und XIII) *zu formulieren*:

XII 

,

XIII 

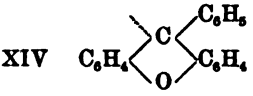
.

Das Conesche *Acridyl* wird durch Reduktion in wäßriger Lösung *mittels Zinkstaubs*, ja sogar mit metallischem *Kupfer oder Silber* erhalten, die Alkyl- oder *Arylpyridiniumchloride* hingegen lassen sich nicht durch Zink, sondern *erst durch Natriumamalgam* reduzieren.[1]) Auch

[1]) In gewissen organischen Lösungsmitteln (Nitrobenzol, Benzol usw.) geben allerdings auch die Jodmethylate des Pyridins und des Chinolins bei andauerndem Schütteln mit molekularem Silber gefärbte (braunrote) Lösungen, die Sauerstoff absorbieren, und in denen Cone [Journ. Amer. chem. Soc. **34**, 1704 (1912); Zentralbl. **1913**, I, 548] ebenfalls die Existenz freier Methyle annimmt. Cone verteidigt daher für die Salze *aller* dieser *cyclischen* Basen die Carboxoniumformeln, zumal *offene* quaternäre Ammoniumsalze die Erscheinung nicht zeigen. Bei der Reduktion von N-Dimethyltetrahydro-chinolinium- sowie -isochinoliniumchlorid mit Natriumamalgam tritt allerdings nach Emde [diese Annalen **391**, 93 u. 98 (1912)] ebenfalls eine schnell vorübergehende Dunkelfärbung (schwarz) ein. Hier sind Umlagerungen ausgeschlossen. Möglicherweise existieren die genannten quaternären Salze je nach dem Lösungsmittel in zwei verschiedenen Formen, in Wasser als Ammonium-, in Nitrobenzol usw. als Carboxoniumsalze, d. h. Pseudochloride, etwa so wie das Trinitromethanquecksilber in Benzol usw. als farblose C—Hg-, in Wasser hingegen als gelbe O—Hg-Verbindung vorliegt; vgl. Ley, Ber. d. d. chem. Ges. **34**, 973 (1905).

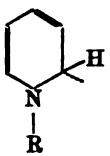
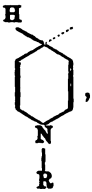
Digitized by Google

die fraglichen *Radikale selber* weisen wesentliche *Unterschiede* auf: unser Pyridinium ist nur im festen Zustande rot, in Lösung blau, das Diphenylacridyl hingegen ist fest und gelöst rot, außerdem ist es in Benzol löslich, worin das Pyridinium ganz unlöslich ist. Das Acridyl gibt ein Superoxyd, das Pyridinium nicht. Die *9-Phenylacridinverbindungen sind* eben doch *Triphenylmethanderivate,* nur mit einem neuen Ringschluß, genau wie das Phenylxanthyl (XIV)

XIV 

von Schlenk[1]), daher ist hier die Existenz eines Radikals mit dreiwertigem Kohlenstoff nicht auffällig. Man darf aber selbst die Pseudoformen XII und XIII der Pyridiniumchloride nicht ohne weiteres mit den Choriden VI und VIII des Diphenylacridans in Parallele setzen.

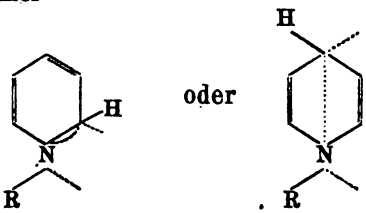
Immerhin verdiente es ernstliche Beachtung, daß trotz vieler Bemühungen bisher *offene* quaternäre *Ammoniumradikale* nur in Form ihrer Amalgame bzw. der „Lösung" in flüssigem Ammoniak, d. h. in beiden Fällen *nur als lockere Verbindungen* erhalten werden konnten. Wenn die *Pyridiniumradikale* dagegen *frei* existenzfähig sind, so liegt dies vielleicht daran, daß hier die „freie, fünfte Valenz" des Stickstoffs innerhalb des Moleküls eine gewisse Absättigungsmöglichkeit gefunden hat. Dies kann kaum anders vor sich gehen, als durch eine Annäherung des Sättigungszustandes III an den Zustand XV oder IV:

III XV  IV  ,

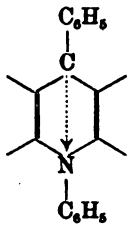
[1]) Diese Annalen **394**, 188 (1912).

Digitized by Google

so daß der Endeffekt in einer *Verteilung der freien Valenz auf* die beiden Atome *Kohlenstoff und Stickstoff*, etwa nach der Formel



besteht, wobei natürlich der den beiden Atomen zukommende Anteil im allgemeinen verschieden sein wird. Man kann sich etwa eine mehr oder weniger weite Verschiebung eines Elektrons[1]) auf der Verbindungslinie zwischen C und N vorstellen. Im Falle des Diphenylacridiniums mag die Annäherung an die reine Methylform fast vollkommen sein[2]), eine gewisse Absättigung der freien Kohlenstoffvalenz durch den in p-Stellung günstig gelegenen, additionsfähigen dreiwertigen Stickstoff nach der Art



jedoch dazu beitragen, daß sich das ja ganz monomolekulare Methyl nicht zum (Hexaphenyl-)Äthan polymerisiert.

Das *Benzylpyridinium* hingegen ist, wie gerade ein Vergleich mit den blauen Lösungen des Tetraäthylammoniums in flüssigem Ammoniak lehrt, *sehr ammonium-*

[1]) D. h. natürlich des Mittelpunktes seiner Schwingungsbahn.

[2]) Das Chlor gehört in dem Diphenylacridiniumchlorid vielleicht überhaupt gar nicht zu einem bestimmten Element, sondern zum ganzen Molekül, ebenso wie auch in der Verbindung $(AuCl_3)H$ der Wasserstoff nicht einem bestimmten Cl-Atom zugeteilt ist.

Digitized by Google

ähnlich, also wohl der Form III sehr nahe. Wenn Herr Schlubach[1]) daher mit Bezug auf die Emmertsche Publikation den Ammoniumcharakter des Benzylpyridiniums ablehnt, so möchten wir hervorheben, daß gerade die *Analogie* unserer *blauen Pyridiniumlösungen mit denen des Natriums in flüssigem Ammoniak* den einen von uns schon im Januar 1920 veranlaßt hat, dies sogenannte Natriumammonium von neuem auf seine Ammoniumnatur hin zu untersuchen.

Von dem in der vorhergehenden Abhandlung beschriebenen reaktionsträgeren N-Benzoylpyridinium glauben wir, daß seine Struktur schon etwas mehr von der reinen Ammoniumform abliegt.

Zu unerwarteten Ergebnissen sind wir hernach gekommen, als wir versuchten, die Ausbeute an Benzylpyridinium dadurch zu verbessern, daß wir von vornherein *unter möglichstem Luftabschluß* arbeiteten, also die Reduktion des Chlorids, das Ausäthern und das Versetzen mit Methylalkohol in einem geschlossenen Apparat in Kohlensäure- oder Wasserstoffatmosphäre — ähnlich der Apparatur zur Darstellung der freien Methyle — vornahmen. Der Erfolg war der, daß wir überhaupt *keine Blaufärbung*, geschweige denn eine Bildung der roten Krystalle erhielten.

Wenn wir im übrigen ohne besonderen Luftausschluß arbeiteten, nur in den Gläsern, in denen die Ätherlösung mit Methylalkohol versetzt wird, die Luft vorher durch Kohlensäure verdrängten, so erhielten wir zwar die Blaufärbung, nicht aber die roten Krystalle; aber auch wenn diese Maßregel unterlassen wurde, trat in den hernach zugeschmolzenen oder fest verstopften, nur etwa halb mit Flüssigkeit (also halb mit Luft!) gefüllten

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 53, 1689 (1920).

Digitized by Google

Gläsern nach anfänglicher Blaufärbung in vielen Fällen wieder Entfärbung, d. h. Aufhellung zu Gelbbraun ein. Ließ man nun neue *Luft zutreten*, so färbte sich die Lösung sofort *intensiv blau*, und erst größerer Luftüberschuß bewirkte wieder Entfärbung.

Daß es sich hier nicht um die Oxydation eines in der ätherischen Lösung etwa enthaltenen Nebenproduktes anderer Zusammensetzung handelt, welches die wahre Muttersubstanz des Benzylpyridiniums wäre, zeigt das Verhalten des reinen, farblosen, krystallisierten *„Dibenzyltetrahydrodipyridyls"*. Erhitzt man dies *im Reagensglas mit Äthylalkohol zum Sieden*, so wird die erst farblose Lösung vorübergehend schwach blau, wieder farblos, dann rötlich und schließlich gelblich. Läßt man nun ruhig erkalten, so daß Luft zutreten kann, so färbt sich die Lösung *von oben her dunkelblau*, bei leisem Bewegen des Glases teilt sich diese Färbung auch den tieferen Schichten mit; bei weiterem Schütteln tritt dann die alte Erscheinung ein, daß die Lösung sich *von oben her entfärbt* und die Färbung in den unteren Schichten wiederkehrt. Wird das Tempo des Farbenwechsels langsamer, so kann man durch abermaliges Erhitzen zum Sieden das ganze Spiel — also erst Färbung von oben her usw. — wiederholen. Mit Methylalkohol treten diese Erscheinungen auch ein, aber weniger deutlich; oft gelingt es überhaupt nicht, farblose siedende Lösungen im offenen Reagensglas zu erhalten. Auch die hellgelben ätherischen Lösungen des rohen Reduktionsproduktes färben sich, wenn sie unter Luftabschluß bereitet worden sind, vorübergehend blauviolett, sobald etwas Sauerstoff zutritt.

Nach alledem muß es als ausgemacht gelten, daß die *Bildung des farbigen „Benzylpyridiniums"* aus dem farblosen „Dibenzyltetrahydrodipyridyl" *nur bei Gegenwart von Luftsauerstoff* erfolgt. Beim Benzoylpyridinium[1])

[1]) Vgl. die vorhergehende Abhandlung.

Digitized by Google

schien ja auch der Übergang der dimolekularen in die monomere Form (in Phenollösung) etwas Sauerstoff zu erfordern; hier handelt es sich aber offenbar nicht um geringe „katalytische", sondern recht erhebliche Mengen von Sauerstoff. Es ist schwer, dafür eine befriedigende *Erklärung* zu finden. Man könnte sogar vermuten, daß das farbige „Benzylpyridinium" nicht die gleiche Zusammensetzung hat wie seine farblose Muttersubstanz, sondern — da eine Aufnahme von Sauerstoff nach der Analyse nicht möglich ist — durch Wegoxydieren einzelner Wasserstoffatome entstanden ist, zumal die Analysenwerte kaum eine Unterscheidung zwischen $C_{12}H_{12}N$ (Benzylpyridinium) und $C_{12}H_{11}N$ zulassen, und unsere Substanz ungereinigt analysiert werden mußte.

Wir sehen jedoch dann keine Möglichkeit, eine dem chemischen Verhalten entsprechende Konstitutionsformel aufzustellen, da die blauen Lösungen so glatt, durch Halogen, wieder Benzylpyridiniumsalze geben.

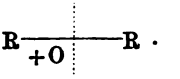
Auch die Annahme, der intensiv gefärbte Körper sei irgendein chinhydronartiges *Zwischenprodukt* bei der zu dem braunen, noch unaufgeklärten Endprodukt führenden *völligen Oxydation* der Dipyridylverbindung, ist unhaltbar; denn dann müßte man erwarten, daß zunächst das farblose Ausgangsprodukt vollständig in das blaulösliche Chinhydron, und erst durch weiteren Sauerstoff dieses dann in das hellere Endprodukt oxydiert würde, es dürfte hingegen die Blaufärbung nach dem Verschwinden nicht immer wieder neu auftreten. Das blaue „Chinhydron" müßte sich dann auch durch Vermischen der fertig oxydierten, gelbbraunen Lösungen mit neuer farbloser Dipyridylverbindung synthetisieren lassen, was nicht der Fall ist.

Noch auf etwas anderes sei hingewiesen, was nicht im Einklange steht mit der Anschauung einer einfachen *„Dissoziation des Dipyridylderivats"* in das monomolekulare Pyridinium: Die *„blau gewordenen"* Lösungen enthalten auch

Digitized by Google

nach wochenlangem Stehen[1]) *noch farblose Substanz*; denn sie färben sich, wenn man sie dann durch Luft entfärbt, bald von neuem blau; in den aus den roten Krystallen hergestellten *„sofort blauen“* Lösungen hingegen kehrt, auch wenn sie monatelang aufbewahrt waren, nach einmaliger Entfärbung die *Bläuung nicht zurück.* Es scheint sich also im ersten Falle *nicht* um ein *„Gleichgewicht“*, sondern um den *Stillstand* einer Reaktion zu handeln.

Nach unseren bisherigen Beobachtungen halten wir es darum für möglich, daß sich in gewissen, besonders in erhitzten, langsam auch in kalten alkoholischen Lösungen aus dem farblosen Hofmannschen Körper ein sehr *oxydables* (gelbbraunes?) *Umlagerungsprodukt* bildet, das dann durch Sauerstoff in noch unbekannter Weise in die rote, blau lösliche Verbindung „Benzylpyridinium“ umgewandelt wird, vielleicht so, daß eine Molekülhälfte ganz oxydiert wird und die andere als solche bleibt nach dem Schema:



Zur endgültigen Klärung dieser Verhältnisse sind noch eingehende weitere Untersuchungen nötig, sowohl der Endprodukte der Oxydation wie des Reduktionswertes der farbigen rot-blauen Verbindung und dergl. mehr. Über deren Ergebnisse sowie über weitere Vertreter der hier behandelten Körperklasse hoffen wir bald wieder berichten zu können.

Versuchsteil.

Das wichtigste Versuchsmaterial ist schon im allgemeinen Teil erwähnt. Im folgenden sind hauptsächlich die präparativen und die analytischen Daten nachgetragen.

[1]) In zugeschmolzenen Röhren.

Digitized by Google

Zur *Darstellung des Benzylpyridiniumchlorids* erhitzt man das Gemisch von 10 g Pyridin und 15 g Benzylchlorid im zugeschmolzenen Reagensglas durch ein allmählich angeheiztes Wasserbad langsam, zuletzt bis gegen 100°. Das Reaktionsprodukt scheidet sich als dickflüssige, braune Schicht zunächst am Boden ab und erfüllt allmählich fast das ganze Gefäß. Bei zu schnellem Anheizen verläuft die Reaktion u. U. so heftig, daß das Rohr explodiert. Das Chlorid erstarrt beim Stehen ganz allmählich, für die folgenden Umsetzungen wurde es meist ölig verwendet, und seine wäßrige Lösung durch Ausschütteln mit Äther von event. anhaftendem Ausgangsmaterial befreit.

Die wäßrige Lösung des Chlorids gibt mit Kobaltinatriumnitrit einen pulvrigen, gelben, ziemlich schwer löslichen Niederschlag des *Benzylpyridinium-hexanitrokobaltiats*, das sich bald in Krystallblättchen verwandelt; Schmelzp. 123° unter Zersetzung.

0,3072 g gaben 0,0566 g $CoSO_4$.

	Ber. für $(C_{12}H_{12}N)_3[Co(NO_2)_6]$	Gef.
Co	6,97	7,01

Die Verbindung ist an Stelle des Chloroplatinats zur Identifizierung der Benzylpyridiniumsalze sehr geeignet.

Reduktion des Benzylpyridiniumchlorids mit Natriumamalgam.

N,N'-Dibenzyltetrahydro-α,α'-(bzw. γ,γ'-)dipyridyl nach A. W. Hofmann bzw. Emmert.

Die Einwirkung von Natriumamalgam auf die ziemlich konzentrierte Lösung des Chlorids läßt man am besten in Kohlensäureatmosphäre vor sich gehen, da sich sonst die zunächst farblos abgeschiedenen Flocken bald gelbbraun färben. Das Ende der Reaktion erkennt man an der auftretenden reichlicheren Wasserstoffentwicklung.

Digitized by Google

Zur *Isolierung* kann man das Reduktionsprodukt nach A. W. Hofmann *in Äther* aufnehmen und *durch Alkohol* fällen. Zweckmäßig schüttelt man im Reduktionsgefäß mit wenig Äther aus, versetzt die Lösung mit dem gleichen Volumen Methylalkohol und etwa $^1/_{10}$ des Gesamtvolumens an Wasser. Aus der in einem verstopften Erlenmeyerkolben befindlichen, bald blau werdenden Lösung scheiden sich, besonders beim Kühlen mit Eiswasser, bald farblose Krystalle ab; diese sind klein und gedrungen, wenn relativ wenig Wasser zugesetzt wurde, bei größerem Wasserzusatz prismatisch. Man wäscht auf der Nutsche mit Methylalkohol und ganz wenig Äther nach und trocknet schnell im Exsiccator über Schwefelsäure. Die reine Substanz ist farblos und färbt sich erst im Laufe eines Tages allmählich schwach bräunlich an. Beim Erhitzen wird sie gegen 80° gelbbraun, beginnt bei etwa 83° zu schmelzen, ist aber erst bei 87° durchgeschmolzen; bei noch höherer Temperatur wird sie ganz dunkel.[1])

Man kann das Produkt aus der *ätherischen Lösung* auch direkt isolieren: die Lösung wird schnell mit Chlorcalcium getrocknet und dann bei Zimmertemperatur im Vakuum *abgedampft*, während durch die Kapillare Kohlensäure geleitet wird. Dabei tritt in der Regel nach einiger Zeit eine blauviolette Färbung ein, die nur dann vermieden wird, wenn die ganzen Manipulationen unter völligem Luftausschluß vorgenommen worden sind. Die erhaltenen Krystallkrusten sind durch bräunliches Harz verunreinigt, von dem sie durch Waschen mit Methylalkohol befreit werden können. Durch bloßes Abdunsten der ätherischen Lösung an der freien Luft erhält man ebenfalls krystallisierte Substanz, sogar in derben, gut ausgebildeten Krystallen bis zu 2 mm Größe, allerdings oberflächlich stark verunreinigt.

---

[1]) Über den Schmelzpunkt findet sich in der Literatur keine Angabe.

Digitized by Google

Da das *rohe Reduktionsprodukt* in der wäßrigen Suspension allmählich krystallin wird, haben wir es zuweilen auch *unmittelbar abgesaugt*, mit Wasser gewaschen und dann getrocknet. In diesem Zustande ist es allerdings sehr zersetzlich und färbt sich, selbst im Exsiccator, bald ganz dunkel. Man kann es in frischem Zustand vollkommen reinigen durch Aufnehmen in wenig Äther und Fällen mit Methylalkohol, wie oben angegeben.

Die Substanz für die C–H-Bestimmung war direkt aus der ätherischen Lösung durch Abdampfen, für die Stickstoffbestimmung durch Ausfällen erhalten.

0,1629 g gaben 0,5018 CO_2 und 0,1037 H_2O.
0,2872 g „ 20,2 ccm Stickgas bei 15,5° und 763 mm Druck.

	Ber. für $C_{24}H_{24}N_2$	Gef.
C	84,54	84,03
H	7,11	7,12
N	8,23	8,22

Verhalten gegen Lösungsmittel. Die Substanz ist schwer löslich in kaltem, leichter in warmem Methyl- und Äthylalkohol, leichter löslich in Äther, Benzol und Aceton. Das Verhalten der alkoholischen Lösungen ist bereits oben beschrieben. Die ätherische Lösung wird beim Erhitzen im Reagenzglas etwas trüb und schwach rötlich violett; beim Schütteln mit Luft verschwindet die Farbe wieder. Die Lösung ist dann gelblich braun. Die zuerst fast farblose Benzollösung wird beim Kochen rotbraun und zeigt hernach keine wesentliche Veränderung. Die Acetonlösung färbt sich beim Erhitzen im offenen Reagensglas vorübergehend blau. Beim Übergießen mit Eisessig wird die feste Substanz dunkelbraun, beim Erhitzen geht sie mit tiefbrauner Farbe in Lösung; Blaufärbung wurde nicht beobachtet.

Die Lösung in Nitrobenzol ist braunstichig rot, beim Erhitzen wird sie braun. Dimethylanilin löst fast farblos. Geschmolzenes Phenol [(von 40°) färbt die feste Substanz sofort häßlich grünschwarz, beim Anwärmen bilden sich blaugrüne Schlieren, die jedoch schnell

Digitized by Google

wieder verschwinden. Die Endfarbe ist ein schmutziges Braun.

Die *Molekulargewichtsbestimmungen* müssen in indifferenter Gasatmosphäre ausgeführt werden unter Verwendung der beim Benzoylpyridinium erprobten (s. vorhergehende Abhandlg. S. 176, 177) Apparatur, sonst erhält man, wenigstens nach der Siedemethode, ganz springende Werte.

Für „Dibenzyltetrahydrodipyridyl" $C_{24}H_{24}N_2$ ber. Molgew. = 340.

I. Gefrierpunktserniedrigung in Benzol; Wasserstoff durch $CrCl_2$ gereinigt.

1. 0,2246 g in 22,53 g Benzol gaben $\Delta = 0{,}194°$.
2. 0,1396 g „ 20,96 g „ „ $\Delta = 0{,}128°$.

Gef. Molgew.: 1. 262, 2. 265.

II. Siedepunktserhöhung in Benzol; CO_2 mit $CrCl_2$ gereinigt.

1. 0,2087 und hernach 0,1962 g in 18,62 g Benzol gaben $\Delta =$ 0,120° und 0,080°.
2. 0,1037 g in 16,65 g Benzol gaben $\Delta = 0{,}053°$.
3. 0,1497 g „ 16,70 g „ „ $\Delta = 0{,}093°$.

Gef. Molgew.: 1. 243 u. 340, 2. 306, 3. 250.

III. Siedepunktserhöhung in Aceton; Wasserstoff durch $CrCl_2$ gereinigt.

1. 0,2234 g in 14,86 g Aceton gaben $\Delta = 0{,}079°$.
2. 0,2678 g „ 13,56 g „ „ $\Delta = 0{,}104°$.
3. 0,3125 g „ 13,25 g „ „ $\Delta = 0{,}130°$.

Gef. Molgew.: 1. 343, 2. 342, 3. 327.

Beim Anheizen wurden die Acetonlösungen schwach blau, beim lebhaften Sieden braungelb; wenn nach dem Abkühlen Luft zugelassen wurde, trat ziemlich starke Blaufärbung auf, also auch hier dieselbe Erscheinung wie in Alkohol! Durch mehr Luft verschwand die blaue Farbe natürlich wieder.

Das freie Benzylpyridinium.

Die ätherische Rohlösung des farblosen Dimolekularen wird mit dem gleichen Volumen Methylalkohol und etwa

Digitized by Google

$^1/_{20}$ des Gesamtvolumens an Wasser versetzt und nun in halb gefüllten (luftenthaltenden) Gläsern luftdicht verschlossen oder eingeschmolzen. Aus der blauen Lösung scheidet sich zuerst das farblose Produkt ab, nach einiger Zeit — Stunden bis Tagen — erscheinen aber daneben braunrote, unter der Flüssigkeit ganz dunkel erscheinende, meist längliche, zackige Krystalle, die fest an den Gefäßwänden haften; u. U. genügt die zunächst vorhandene Luftmenge noch nicht, und die erst blaue Lösung wird später blaugrün oder gar braun. Dann muß man durch kurzes, event. sogar wiederholtes Öffnen des Gefäßes neu Luft zulassen, wobei sofort intensive Blaufärbung eintritt. Wenn sich die Menge der dunklen Krystalle nicht mehr vermehrt, muß man sie bald abfiltrieren, da sie sich bei zu langem Verweilen unter der Mutterlauge zersetzen und an ihrer Stelle ein braunes Harz in kleinen Tropfen die Gefäßwände bedeckt. Für rohe Versuche, wenn es z. B. nur darauf ankommt, eine alkoholische Lösung zu bereiten, kann man die Krystalle so isolieren, daß man die Lösung abgießt und zur Entfernung etwa noch vorhandenen farblosen Produktes mit Äther unter Dekantieren auswäscht; dabei setzt man dem Äther etwas Methylalkohol zu, da die Waschflüssigkeit sich sonst trübt und die Krystalle klebrig werden.

Zur *Reindarstellung* filtrierten wir das Produkt in folgendem *Apparat*: Ein mit Filterplatte versehener Vorstoß ist auf eine Saugflasche aufgesetzt und mit einem dicht schließenden Stopfen versehen, der in der einen Bohrung ein Einleitungsrohr für reine trockne Kohlensäure, in der andern einen für das Waschmittel bestimmten Tropftrichter trägt; letzterer steht durch eine Abzweigung ebenfalls in Verbindung mit dem Kohlensäure-Kipp. Durch passend angebrachte Hähne kann man die Kohlensäure durch das Einleitungsrohr oder den Tropftrichter oder durch beide leiten. Nachdem der ganze Apparat mit Kohlensäure gefüllt und ein Gemisch von

Digitized by Google

3 Vol. Äther mit 1 Vol. Methylalkohol in den Tropftrichter gebracht ist, hebt man den Stopfen von dem Vorstoß etwas auf und gießt unter ständigem Überleiten von Kohlensäure die Lösung mit den Krystallen auf das Filter. Damit bei dem Öffnen die schwere Kohlensäure nicht aus dem hoch gelegenen Vorstoß heruntersinkt, trägt das Ansatzrohr der Saugflasche ein senkrecht nach oben gebogenes Rohr, das bis zur vollen Höhe des Vorstoßes reicht. Man läßt die Flüssigkeit zunächst unter ihrem eigenen, hernach wenn alles eingefüllt und der Stopfen wieder aufgesetzt ist, unter dem Druck des Kohlensäureapparates filtrieren, wäscht dann einigemal mit dem Äther–Alkoholgemisch aus dem Tropftrichter aus — das sich dabei intensiv *violett* anfärbt — und trocknet schließlich die auf dem Filter liegenden Krystalle durch weiteres, mindestens $^1/_4$ stündiges Überleiten von Kohlensäure in ziemlich kräftigem Strom. Durch Erwärmen des Vorstoßes mit der Hand kann man das Trocknen etwas beschleunigen.

Die *abgesaugten Krystalle* erscheinen nicht braunrot, sondern beinahe schwarz, mit einem schwachen bronzegrünen Schimmer. Nach dem Öffnen des Vorstoßes sind sie zunächst ganz hart und trocken, werden jedoch an der Luft in wenigen Minuten etwas klebrig und backen zusammen. In einem Gefäß mit Kohlensäure eingeschmolzen, scheinen sie ziemlich haltbar zu sein. Der Schmelzpunkt (bzw. Zersetzungspunkt) läßt sich nur roh bestimmen und liegt oberhalb 140°.

Zur Analyse wurde die Substanz direkt aus dem Vorstoß in ein Verbrennungsschiffchen gefüllt, und dann in einem Wägerohr mit übergeschliffenem, gut gefettetem Stopfen gewogen; die Sauerstoffaufnahme während des Wägens störte dann nicht mehr.

0,1034 g gaben 0,3222 CO_2 und 0,0690 H_2O.
0,1150 g „ 0,3552 CO_2 „ 0,0755 H_2O.
0,1025 g „ 0,3171 CO_2 „ 0,0704 H_2O.
0,0520 g „ 3,4 ccm Stickgas bei 17,5° und 778 mm Druck.

Digitized by Google

	Ber. für $C_{12}H_{12}N$		Gef.	
C	84,72	85,00	84,26	84,57
H	7,06	7,45	7,35	7,51
N	8,23	7,95		

Das *krystallisierte Benzylpyridinium löst sich* mit blauer Farbe relativ schwer und langsam in Methyl- und Äthylalkohol auf. Die Farbe der Lösungen ist äußerst intensiv, ganz rein blau, und im zugeschmolzenen Rohr monatelang unveränderlich, während die „blau gewordenen" alkoholischen Lösungen des farblosen Dimeren wenigstens mit der Zeit grünstichig werden oder sich ganz zersetzen. Erhitzen bis gegen 80° bewirkt keine Veränderung; beim Abkühlen in Kohlensäure-Äther werden die Lösungen etwas violettstichiger. Äther und Benzol lösen nicht und werden nicht angefärbt. Eisessig löst leicht und schnell mit intensiv blauer Farbe. Diese Lösungen scheinen ganz besonders leicht oxydierbar zu sein. Außerdem entfärben sie sich selbst im zugeschmolzenen Rohr mit Kohlensäureatmosphäre nach einer Reihe von Tagen, viel schneller (innerhalb einer Stunde) beim Erhitzen auf etwa 70°. In Nitrobenzol und geschmolzenem Phenol ist das Benzylpyridinium ebenfalls leicht löslich mit blauer Farbe.

Digitized by Google

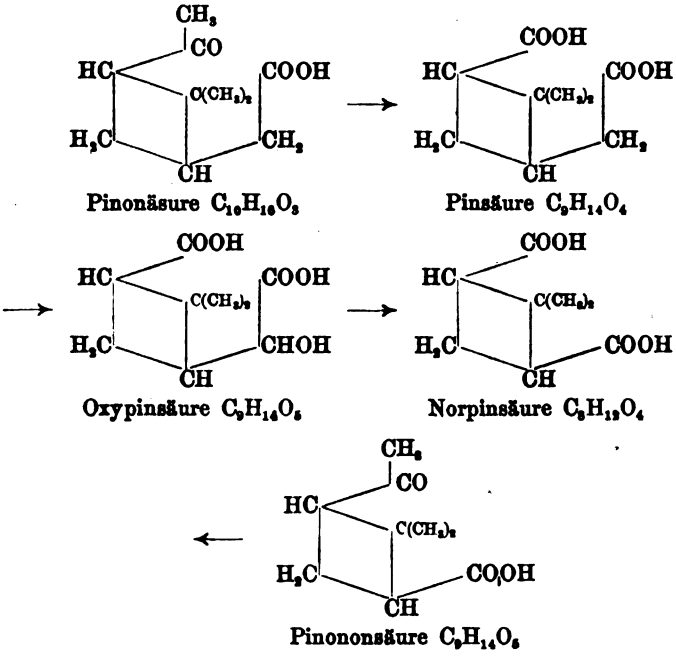
Über Olibanole;

von *Emil Fromm* und *Richard Klein.*

[Mitteilung aus dem Chemischen Universitätslaboratorium zu Freiburg i. B.]

(Eingelaufen am 8. Januar 1921.)

Pinonsäure ist von v. Baeyer[1]) über Pinsäure und Oxypinsäure zur Norpinsäure abgebaut worden. Pinononsäure haben Wagner und Erschtschikowski[2]) durch Bromlauge in dieselbe Norpinsäure verwandelt. Gegen die Konstitutionsformeln, welche zuletzt von den genannten Autoren festgestellt sind, dürften sich Einwände kaum mehr ergeben.



[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 29, 1911 (1896).
[2]) Ber. d. d. chem. Ges. 29, 881 (1896).

Digitized by Google

Pinononsäure wurde gewonnen von Wagner und Erschtschikowski[1]) durch Permanganatoxydation des Pinens, von Kerschbaum[2]) durch Oxydation des Verbenons aus Verbenaöl, von Blumann und Zeitschel[3]) durch Oxydation von Verbenon und Verbenol, welche sie unter den Autoxydationsprodukten des Pinens fanden, endlich von Fromm und Autin[4]) durch Abbau des Olibanols aus Weihrauchöl. Als Abbauprodukt so verschiedener Naturstoffe ist die Pinononsäure besonders wichtig; um so mehr ist es zu bedauern, daß die Identität der von den verschiedenen Forschern gewonnenen Pinononsäuren nicht mit voller Sicherheit feststeht. Die Säure schmilzt nach Wagner bei 128—129°, nach Kerschbaum bei 127—128°, nach Blumann und Zeitschel in der l-Modifikation bei 124—128°, in der d-Modifikation bei 128—129°, nach Fromm und Autin bei 130°. Ihr Oxim soll nach Wagner und Erschtschikowski bei 178° (wahrscheinlich Schreibfehler) schmelzen und schmilzt nach Fromm und Autin bei 187°. Für das Semicarbazon der Säure geben Kerschbaum den Schmelzp. zu 212°, Blumann und Zeitschel zu 204° und Fromm und Autin zu 209° an. Eine besondere Schwierigkeit erwächst noch aus dem Umstande, daß das Pinonsäuresemicarbazon, wie sich zeigte, ebenfalls den Schmelzpunkt 204° zeigt.

So erschien es notwendig, die aus den verschiedenen Ausgangsmaterialien gewonnenen Pinononsäuren miteinander selbst und in ihren Abkömmlingen zu vergleichen. Blumann und Zeitschel haben nun bereits[5]) festgestellt, daß ein von Kerschbaum ihnen überlassenes Präparat von Pinononsäuresemicarbazon aus Verbenon mit dem ihren aus den Autoxydationsprodukten des

[1]) a. a. O.
[2]) Ber. d. d. chem. Ges. **33**, 885 (1900).
[3]) Ber. d. d. chem. Ges. **46**, 1178 (1913).
[4]) Diese Annalen **401**, 253 (1913).
[5]) Ber. d. d. chem. Ges. **46**, 1183 (1913).

Digitized by Google

Pinens keine Schmelzpunktsdepression ergab und daß demnach beide Präparate identisch sind. Auch uns hat Herr Dr. Kerschbaum liebenswürdigerweise ein kleines Präparat seines Semicarbazons überlassen, genug, um damit festzustellen, daß es auch mit dem Pinononsäuresemicarbazon aus Olibanol von Fromm und Autin keine Depression gibt und daß beide Präparate bei genauer Nachprüfung den von Blumann und Zeitschel angegebenen Schmelzp. 204° zeigen. Demnach sind alle diese Stoffe identisch. So bleibt nur noch die Pinononsäure übrig, welche Wagner und Erschtschikowski durch Permanganatoxydation von Pinen erhalten hatten. Diese haben wir uns selbst darzustellen versucht und zu diesem Zwecke reines französisches Pinen von der Firma Schimmel & Co., Siedep. 156—158°, D_{18} 0,8683, sorgfältig auf dem Wasserbade im Vakuum und darauf unter Atmosphärendruck rektifiziert und das so gewonnene Produkt genau nach der Vorschrift von Wagner mit 1prozentiger kalter Permanganatlösung oxydiert. Es ergab sich bei Wiederholung der Oxydation, daß die Ergebnisse sich nicht ändern, wenn man auch mit 5prozentiger Permanganatlösung arbeitet. Die Oxydationsprodukte wurden in einen neutralen und einen sauren Teil zerlegt. Der neutrale Teil enthielt noch viel unverändertes Pinen, welches bei weiteren Oxydationen abgebaut werden konnte. Das Gemenge von Säuren wurde mit je einem Äquivalent Semicarbazidchlorhydrat und Natriumacetat behandelt, wobei ein Semicarbazon isoliert wurde, welches den gleichen Schmelzpunkt aufwies wie das Pinononsäuresemicarbazon; nämlich 204°. Dennoch war das so dargestellte Semicarbazon nicht das der Pinononsäure, da es mit reinem Pinononsäuecarbazon aus Verbenon von Kerschbaum oder solchem aus Olibanol von Fromm und Autin eine wesentliche Schmelzpunktserniedrigung gab. Seine Zusammensetzung stimmt auf nicht ganz reines *Pinonsäuresemicarbazon*:

Digitized by Google

0,1380 g gaben 0,2776 CO_2 und 0,1064 H_2O.
0,1373 g „ 0,2782 CO_2 „ 0,1060 H_2O.
0,1402 g „ 22 ccm Stickgas bei 22° und 744 mm Druck.
0,1543 g „ 24,8 ccm Stickgas bei 23,5° und 743 mm Druck.

	Ber. für $C_{11}H_{19}O_3N_3$	Gef.	
C	54,75	54,88	55,28
H	7,94	8,63	8,64
N	17,3	17,6	18,09

Das neue Semicarbazon wird leicht bei der Behandlung mit verdünnter Salzsäure gespalten und liefert hierbei ein Gemenge von zwei Säuren, von denen eine bei 100° schmolz und nur in sehr geringer Menge entsteht, während die andere bei 62° wie die *Pinonsäure* schmilzt und auch deren Zusammensetzung hat:

0,1186 g gaben 0,2814 CO_2 und 0,0939 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{16}O_3$	Gef.
C	65,17	64,73
H	8,76	8,86

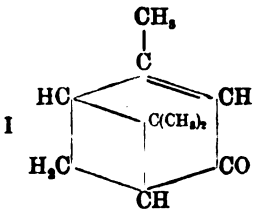
Da sich das Semicarbazon der Pinononsäure, wie man sich an anderen Versuchen überzeugen konnte, auch aus Gemischen sehr leicht ausscheidet, so war hier kein Zweifel, daß bei der Oxydation ganz reinen Pinens *Pinononsäure auch nicht in Spuren* entstanden sein konnte. Auch die naheliegende Annahme, daß Wagner und Erschtschikowski die Oxydation so lange weiter geführt hätten, bis die Pinonsäure zu Pinononsäure oxydiert war, ist nicht zu halten; denn es ließ sich leicht zeigen, daß Pinonsäure bei der Oxydation mit Permanganatlösung in der Kälte nicht angegriffen wird, auch nach zweimaliger Nachoxydation wurde aus der Permanganatlösung nur unveränderte Pinonsäure als Semicarbazon isoliert.

Da reines Pinen also bei der Permanganatoxydation keine Pinononsäure liefert, so muß die von Wagner und Erschtschikowski erhaltene Säure aus einer Verunreinigung des Pinens abstammen. Welcher Art diese Verunreinigung gewesen sein mag, läßt sich nach den Untersuchungen von Blumann und Zeitschel leicht

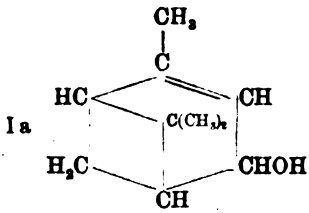
Digitized by Google

vermuten, nämlich die verbenon- und verbenolhaltigen Autoxydationsprodukte des Pinens.

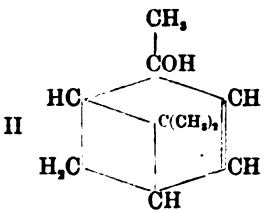
Dem Verbenon $C_{10}H_{14}O$, welches sich zu Pinononsäure oxydieren läßt, kommt ohne Zweifel die Formel I zu. Die Stoffe $C_{10}H_{16}O$, welche bei der Oxydation Pinononsäure liefern, können nur die Formeln Ia, II, III und IIIa, sowie IV und IVa haben. Verbenol, der Alkohol des Ketons Verbenon I, muß der Formel Ia entsprechen, Dihydroverbenon, das Hydrierungsprodukt des Verbenons, entspricht demnach der Formel IIIa. Da III nur die Enolform von IIIa ist, so bleiben nur noch die Formeln II und IV, sowie die Ketoform des letzteren IVa für das Olibanol von Fromm und Autin, welches gleichfalls bei der Oxydation Pinononsäure liefert, übrig, vorausgesetzt, daß sich Olibanol nicht als identisch mit Verbenol oder Dihydroverbenon erweisen sollte.

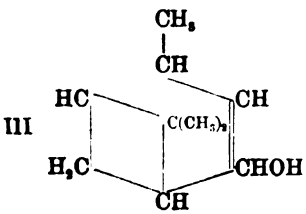


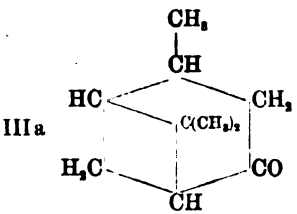
Verbenon



Verbenol

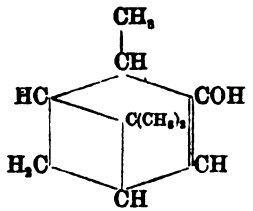


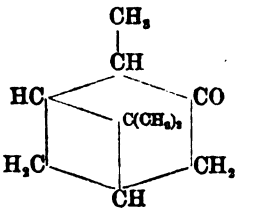




Dihydroverbenon

Digitized by Google

IV 

IVa 

Zur Entscheidung dieser Fragen wurde die Untersuchung des Weihrauchöles wieder aufgenommen und zur Gewinnung von Olibanol 1 kg terpenfreies Weihrauchöl der Firma Schimmel & Co. in Miltitz der fraktionierten Destillation unterworfen. Diese wurde diesesmal abweichend von dem ehedem von Fromm und Autin angewendeten Verfahren in vacuo durchgeführt, und es gelang leicht, wieder eine Fraktion als rein zu erkennen, welche Siedep.$_{22}$ 117—119°, Siedep. 210—211°, D_{18} 0,9504 zeigte. Das war augenscheinlich das Olibanol von Fromm und Autin, um so mehr als es die Zusammensetzung $C_{10}H_{16}O$ hatte.

0,1185 g gaben 0,3414 CO_2 und 0,1161 H_2O.
0,1078 g „ 0,3106 CO_2 „ 0,0986 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{16}O$	Gef.	
C	78,88	78,60	78,60
H	10,60	10,96	10,24

Das durch Vakuumdestillation gewonnene Olibanol ließ sich auch wie das von Fromm und Autin mit Permanganat oxydieren und lieferte bei der Oxydation auch saure Produkte, diese enthielten aber erstaunlicherweise keine Spur von krystallisierender Säure, auch ist es auf keine Weise gelungen, mit Semicarbazid ein Semicarbazon daraus abzuscheiden. Kurz, es war überhaupt keine Pinononsäure entstanden. Es zeigte sich bald, daß man das pinononsäureliefernde Olibanol nur dann erhält, wenn man nicht im Vakuum, sondern unter Atmosphärendruck destilliert. Es genügt, das in vacuo erhaltene Produkt einige Male direkt zu destillieren und das Destillat zu oxydieren, um wieder gute Ausbeuten an Pinononsäure zu erhalten. Demnach gibt es zwei Oli-

Digitized by Google

banole, eines welches sich im natürlichen Weihrauchöl findet und bei der Oxydation keine Pinonsäure liefert — wir nennen es in Zukunft α-Olibanol — und eines, welches erst durch Erhitzen über den Siedepunkt durch Umlagerung aus dem Urprodukt entsteht, welches Pinonsäure bei der Oxydation liefert und in Zukunft β-Olibanol heißen soll.

α-Olibanol kann keiner der oben aufgeführten Formeln I—IVa entsprechen, da es bei der Oxydation keine Pinononsäure liefert, ist demnach bestimmt auch weder mit Verbenol noch mit Dihydroverbenon identisch. Mit Natrium reagiert es nur schwach beim Erwärmen, mit Phenylhydrazin, Semicarbazid und Hydroxylamin konnten krystallisierte Produkte bisher nicht gewonnen werden. Auch nach der Oxydation mit Chromsäure war in dem neutralen Produkt eine Carbonylgruppe mit den üblichen Agenzien nicht nachzuweisen. Bei der Oxydation mit Permanganat entsteht, wie bereits erwähnt, keine Pinonsäure, wohl aber eine Säure von honigartiger Konsistenz, welche derjenigen ähnelt, die neben Pinononsäure bei der Oxydation von β-Olibanol entsteht und der Formel $C_{10}H_{16}O_4$ entspricht. Leider konnte aus Materialmangel und wegen der wenig charakteristischen Eigenschaften dieser Säure eine Identifizierung bisher nicht ausgeführt werden.

Reduziert man α-Olibanol mit dem 5 fachen der berechneten Menge Natrium in absolutem Alkohol, so entsteht ein *Dihydroolibanol* $C_{10}H_{18}O$, ein farbloses Öl von salbeiartigem Geruche, Siedep.$_{25}$ 100—102°.

0,1360 g gaben 0,3848 CO_2 und 0,1380 H_2O.
0,1370 g „ 0,3912 CO_2.

	Ber. für $C_{10}H_{18}O$	Gef.	
C	77,85	77,19	77,9
H	11,76	11,35	

Dieser Stoff hat die Eigenschaften eines Alkohols; denn er ist oxydierbar durch Permanganat, liefert einen Essigsäureester, welcher gegen Permanganat beständig ist, und einen o-Nitrobenzoesäureester, Schmelzp. 135 bis

Digitized by Google

137°. Das Dihydroolibanol ist nicht identisch mit dem Dihydroverbenol von Blumann und Zeitschel, welches ähnlich gewonnen wird, der gleichen Summenformel entspricht, aber fest ist und bei 58° schmilzt.

Ein Versuch, β-Olibanol auf dieselbe Art zu reduzieren, zeigte, daß hierbei neben harzigen Produkten nur unverändertes β-Olibanol wiedergewonnen wurde.

0,1809 g gaben 0,3797 CO_2 und 0,1180 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{16}O$	Gef.
C	78,88	79,13
H	10,60	10,00

Dies Ergebnis ist insofern von Bedeutung, als es zeigt, daß β-Olibanol mit Dihydroverbenon und auch wohl mit Verbenol nicht identisch sein kann. Demnach würden für diesen Stoff nur noch die obigen Formeln II, IV und IVa übrigbleiben.

Um mehr Ausgangsmaterial zu erhalten, erbaten und erhielten wir von der Firma Schimmel & Co. eine neue Menge Olibanumöl, diesesmal jedoch terpenhaltiges. Als dies Präparat der Destillation in vacuo unterworfen wurde, erhielt man wieder einen Stoff, Siedep.$_{15}$ 114 bis 116°, D_{18} 0,9502 von der Zusammensetzung $C_{10}H_{16}O$.

0,1122 g gaben 0,3231 CO_2 und 0,1055 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{16}O$	Gef.
C	78,88	78,56
H	10,60	10,52

Dieser Stoff ist aber leider nicht identisch mit dem α-Olibanol; denn er läßt sich nicht wie dieses reduzieren und liefert beim Erhitzen über seinen Siedepunkt kein β-Olibanol, das zu Pinononsäure oxydiert werden kann. Der neue Stoff mag darum γ-Olibanol heißen. Er liefert bei der Oxydation eine flüssige Säure und reagiert nicht mit Semicarbazid.

In diesem Stadium wurde die Untersuchung durch den Krieg unterbrochen. Das Weihrauchöl, welches das γ-Olibanol geliefert hatte, stand fünf Jahre lang in geschlossenem Gefäße. Nach dieser Frist wurde es aber-

Digitized by Google

mals untersucht, um festzustellen, ob sich nicht etwa in dem Öle beim Altern α-Olibanol gebildet hatte; diese Untersuchung verlief ohne das genannte Ergebnis, es war auch nach fünf Jahren keine Spur davon gebildet.

Es dürfte jetzt sehr schwer sein, neue Mengen Weihrauchöl zu erhalten; sobald das gelungen sein wird, soll die Untersuchung fortgesetzt werden. Sie wurde mit Mitteln der Wissenschaftlichen Gesellschaft von Freiburg i. B., welcher auch an dieser Stelle für die Unterstützung gedankt sei, durchgeführt.

(Geschlossen den 11. Juli 1921.)

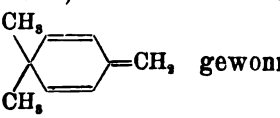
Digitized by Google

[Mitteilungen aus dem Chemischen Institut der Universität Marburg.]

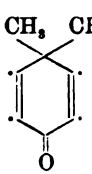
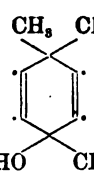
I. Über Kohlenwasserstoffe der Semibenzolgruppe;

von *K. v. Auwers* und *K. Ziegler*.

(Eingelaufen am 4. Oktober 1920.)

Von den dreifach ungesättigten hydroaromatischen Isomeren der aromatischen Kohlenwasserstoffe, die wegen ihrer semicyclischen Doppelbindung die Bezeichnung „*Semibenzole*“ erhalten haben, wurde bisher nur ein Vertreter, die Verbindung  gewonnen[1]), und die Untersuchung dieses Körpers konnte seinerzeit nicht mit der wünschenswerten Gründlichkeit durchgeführt werden. Um diese interessante Körpergruppe genauer kennen zu lernen, haben wir einige Homologe jenes Kohlenwasserstoffs dargestellt und die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser Substanzen, namentlich die Art ihres Überganges in aromatische Verbindungen, etwas eingehender studiert.

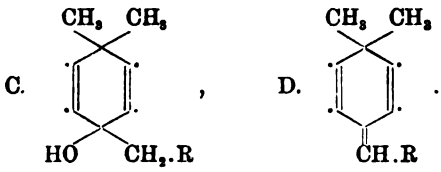
Die Ausgangsmaterialien bildeten die aus Phenolen, Chloroform und Alkali erhältlichen hydroaromatischen Ketone vom Typus A, aus denen man nach der Grignardschen Reaktion die Carbinole B und weiter durch Reduktion die Alkohole C gewann. Wasserabspaltung lieferte die Semibenzole D.

A.  , B.  ,

[1]) Auwers u. K. Müller, Ber. d. d. chem. Ges. **44**, 1595 (1911).

[2]) R = Wasserstoff oder Alkyl.

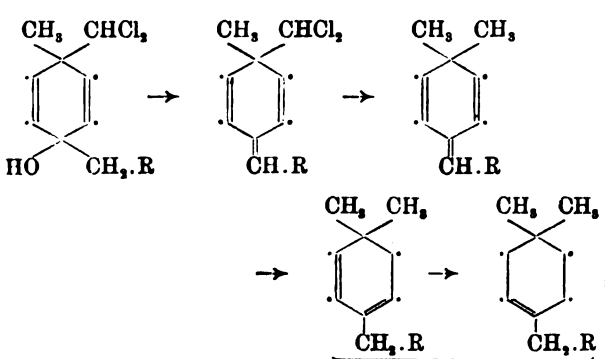
Digitized by Google



Die 1,1-Dimethylcyclohexadien-(2,5)-ole-(4).

Die Reduktion der chlorhaltigen Carbinole B wurde, wie früher, mit Natrium in feuchtem Äther durchgeführt. Unsere Bemühungen, die Ausbeuten zu verbessern, hatten leider wenig Erfolg, denn nach wie vor entstanden neben den Alkoholen beträchtliche Mengen von Kohlenwasserstoffen; suchte man aber deren Bildung durch Abkürzung der Versuchsdauer herabzudrücken, so blieb ein entsprechender Teil des Ausgangsmaterials unreduziert. Einheitliche Verbindungen aus dem Kohlenwasserstoffgemisch zu isolieren gelang nicht; Verbrennungen und Titrationen mit Brom deuteten darauf hin, daß regelmäßig Gemenge von einfach und von zweifach ungesättigten Kohlenwasserstoffen vorlagen.

Wahrscheinlich vollzieht sich die Entstehung dieser Substanzen nach dem Schema



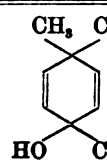
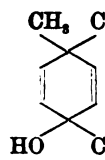
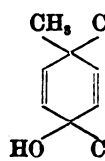
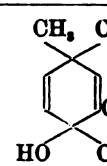
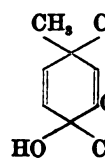
doch mögen sich auch die bereits entstandenen chlorfreien Carbinole an der Bildung dieser Kohlenwasserstoffe beteiligen. Da es vorläufig kein Mittel gibt, die Wasserabspaltung dieser empfindlichen Alkohole zu ver-

Digitized by Google

hüten, sind die Aussichten auf eine gründliche Verbesserung des Verfahrens gering, und man wird sich daher wohl auch in Zukunft mit den bisherigen Ausbeuten, die selten mehr als 20—25 Proz. d. Th. betragen, begnügen müssen.

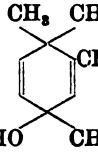
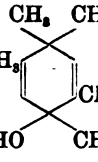
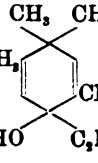
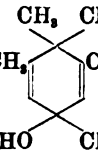
Einen Überblick über die bisher dargestellten Carbinole und ihren Reinheitsgrad gibt die folgende Tabelle.

Tabelle I. *Carbinole.*

Ausgangsmaterial	Nr.	Formel	Schmelzpunkt	Bemerkungen
p-Kresol	I		43—44°	Rein. Zersetzt sich beim Aufbewahren in einigen Wochen.
	II		46—47°	desgl.
	III		Öl. Wurde bei −20° sirupös	Sehr unrein; noch stark chlorhaltig.
as. m-Xylenol	IV		51,5°	Rein. Einige Wochen beständig.
	V		47—48°	Rein. Fing schon nach wenigen Tagen an sich zu zersetzen.

Digitized by Google

Tabelle I (Fortsetzung).

Ausgangsmaterial	Nr.	Formel	Schmelzpunkt	Bemerkungen
as. o-Xylenol	VI		Unter + 20°; bei − 20° fest	Bei Zimmertemp. halbfest. Erstarrte in einer Kältemischung vollkommen. Der Analyse und dem optischen Verhalten nach rein.
Pseudocumenol	VII		Öl	Gelblich gefärbt. Gab richtige Analysenwerte, war aber nach seinem optisch. Verhalten nicht ganz rein.
	VIII		Öl	Sehr unrein. Hatte zum großen Teil schon Wasser abgespalten.
Hemellithenol	IX		Öl	desgl.

Soweit die Alkohole in zuverlässig reinem Zustand gewonnen werden konnten, stellen sie sämtlich farblose, gut krystallisierte Verbindungen dar, die in allen gebräuchlichen organischen Mitteln schon in der Kälte leicht löslich sind, jedoch aus niedrigsiedendem Petroläther umkrystallisiert werden können. Auch in kaltem Wasser sind sie ziemlich löslich.

Diejenigen Präparate, die bei Zimmertemperatur ölig blieben oder nur halbfest wurden, bestanden zum Teil vielleicht aus Gemischen stereoisomerer Formen, wie sie bei den entsprechenden chlorhaltigen Carbinolen beobachtet worden sind. In anderen Fällen liegen aber

Digitized by Google

Produkte vor, die noch Chlorderivat beigemengt enthielten oder bereits zum Teil in das Semibenzolderivat übergegangen waren. Die Versuche, aus solchen Gemischen durch wiederholte Rektifikation im Vakuum die reinen Carbinole herauszuarbeiten, scheiterten in der Regel an der großen Empfindlichkeit dieser Körper gegen Säuren. Unter Ausschluß von Säuren können die reinen Carbinole unzersetzt im Vakuum destilliert werden, enthalten aber die Rohprodukte noch chlorhaltiges Ausgangsmaterial und zersetzt sich dieses bei der Destillation. so bewirkt die frei werdende Salzsäure alsbald eine weitgehende Abspaltung von Wasser. Als beispielsweise gelegentlich 8 g annähernd reiner Alkohol II, der in völlig reinem Zustand ohne jede Zersetzung siedet, im Vakuum rektifiziert werden sollten, verwandelte sich der größte Teil in Kohlenwasserstoff, und nur 1,5 g krystallisiertes Carbinol konnten aus dem Destillat gewonnen werden. Auch die Spuren von Säuren, die regelmäßig in der Laboratoriumsluft enthalten sind, scheinen schädlich wirken zu können, wie schon früher[1]) bei der Besprechung des unregelmäßigen Verhaltens dieser und anderer tertiärer Alkohole beim Sieden hervorgehoben wurde.

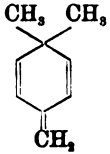
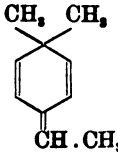
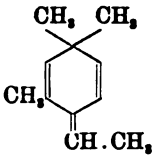
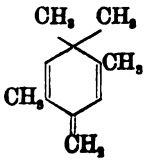
Wir haben daher, um nicht durch einen unglücklichen Zufall Material zu verlieren, meist von der Destillation größerer Mengen der gereinigten Carbinole abgesehen und können daher die Siedepunkte von den meisten dieser Verbindungen nicht scharf angeben. Nur die Siedepunkte der Alkohole I und VI wurden einigermaßen genau bestimmt: der erste siedet unter 18 mm Druck bei 66—69,5°, der zweite unter 17 mm bei 90—95°.

Alle diese Carbinole sind schon bei gewöhnlicher Temperatur recht flüchtig und besitzen einen charakteristischen, durchdringenden Geruch. Da die beiden Doppelbindungen in ihren Molekülen nicht konjugiert sind, verhalten sich diese Verbindungen spektrochemisch normal, wie bei dem bequem zu untersuchenden Körper VI

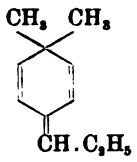
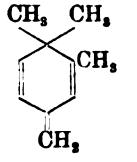
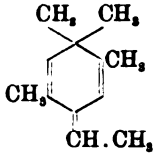
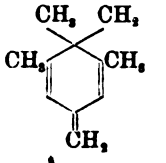
[1]) Ber. d. d. chem. Ges. **44**, 1596 f. (1911).

Digitized by Google

Tabelle II. *Semibenzolkohlenwasserstoffe.*

Nr.	Formel	Siedep.$_{15}$	d_4^{20}	n_D^{20}	$E\,\Sigma_\alpha$	$E\,\Sigma_D$	$E\,\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha$	$E\,\Sigma_\gamma - \Sigma_\alpha$	Bemerkungen
X		37—39°	0,839	1,506	+1,86	+1,94	+53 %	+57 %	Mittelwerte aus den gut übereinstimmenden Beobachtungen an zwei Präparaten.
XI		70—72°	0,857	1,513	+1,60	+1,66	+53 %	+57 %	desgl.
XII		85—86°	0,879	1,516	+0,95	+0,99	+38 %	+41 %	*Eine* Beobachtungsreihe.
XIII		81°	0,877	1,515	+0,95	+0,99	+39 %	+43 %	Mittelwerte aus den gut übereinstimmenden Beobachtungen.

Digitized by Google

XIV		*85—89°*	*0,858*	*1,504*	*+1,11*	*+1,15*	*+40 %*	*+44 %*	Enthielt etwas aromatisches Isomeres und eine Spur Chlor.
XV		*60—65°*	*0,866*	*1,514*	*+1,27*	*+1,31*	*+45 %*	*+48 %*	Enthielt wahrscheinlich etwas höherhydrierte Produkte.
XVI		*94—99°*	*0,880*	*1,513*	*+0,75*	*+0,79*	*+35 %*	*+38 %*	Enthielt wahrscheinlich etwas Carbinol.
XVII		*89—90°*	*0,880*	*1,516*	*+0,93*	*+0,97*	*+41 %*	*+45 %*	Mittelwerte. Das Präparat war aus unreinem Ausgangsmaterial gewonnen.

Digitized by Google

festgestellt wurde, denn aus den Beobachtungen ergaben sich folgende E Σ-Werte:

$$E\,\Sigma_\alpha = +\,0{,}08, \quad E\,\Sigma_D = +\,0{,}07, \quad E\,\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha = +\,2\,\text{Proz.},$$
$$E\,\Sigma_\gamma - \Sigma_\alpha = +\,2\,\text{Proz.}.$$

Die Beständigkeit der einzelnen Substanzen ist, wie die Tabelle zeigt, zwar dem Grade nach verschieden, aber keine von ihnen ist auf die Dauer haltbar; auch die beständigsten fangen nach einigen Wochen an weich zu werden und zerfließen allmählich.

Die Semibenzolkohlenwasserstoffe.

Der leichte Übergang in Kohlenwasserstoffe der Semibenzolreihe unter dem Einfluß von Säuren ist eine ganz allgemeine Reaktion jener Carbinole und typisch für sie. Ist die Einwirkung der Säure zu kräftig, so erfolgt im Anschluß an die Wasserabspaltung sofort die Umlagerung in ein echtes Benzolderivat. Regelmäßig geschieht dies, wenn man die Alkohole mit Schwefelsäure erwärmt oder mit Halogenwasserstoffsäuren behandelt. Dagegen vertragen fast alle Semibenzole das Schütteln mit eiskalter 10 prozentiger Schwefelsäure, die man daher am zweckmäßigsten zu ihrer Darstellung verwendet. Nur der aus dem Carbinol IV zu erwartende Kohlenwasserstoff konnte auf diese Weise nicht erhalten werden, da er sich unter diesen Bedingungen sofort in sein aromatisches Isomeres, das *Durol*, umlagert. Ob etwa in diesem Fall Ameisensäure oder Essigsäure als wasserentziehendes Mittel besser am Platze sein würde, haben wir nicht untersucht, da kein Material mehr zur Verfügung stand.

Im allgemeinen ist die Abspaltung von Wasser nach 10—20 Minuten langem Schütteln mit Schwefelsäure vollendet; nur beim Carbinol V mußte $^3/_4$ Stunde geschüttelt werden. Auch die Verbindung VIII war nach 20 bis 25 Minuten noch nicht vollkommen zersetzt, obwohl sie bei der vorausgegangenen Destillation bereits zum großen Teil Wasser abgespalten hatte.

Die Semibenzole sind noch weit unbeständiger als die Alkohole, aus denen sie entstehen, denn selbst in reinstem

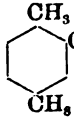
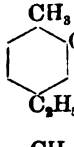
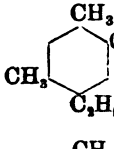
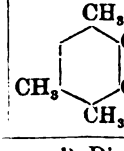
Digitized by Google

Zustand halten sie sich nur wenige Tage unverändert. Sind sie nicht ganz sauber, so polymerisieren sie sich binnen kurzem oder lagern sich rasch in aromatische Kohlenwasserstoffe um. Man kann daher nur aus vollkommen gereinigten Präparaten der Carbinole die Semibenzole rein gewinnen.

Von den in der Tabelle II S. 222 u. 223 zusammengestellten Verbindungen können nur die *ersten vier* als *völlig rein* angesehen werden. Der Reinheitsgrad der zweiten vier war verschieden; doch waren sie alle so hochprozentig, daß sie zum Vergleich immerhin mit herangezogen werden dürfen. Zur Unterscheidung von den reinen Verbindungen sind die Konstanten dieser Substanzen *kursiv* gedruckt.

Um den Vergleich mit den aromatischen Isomeren zu erleichtern, geben wir in der folgenden kleinen Tabelle die physikalischen Daten der Benzolderivate, in die sich die ersten vier Verbindungen von Tabelle II umlagern.

Tabelle III. *Aromatische Kohlenwasserstoffe.*

Nr.	Formel	Siedep.$_{15}$	d_4^{20}	n_D^{20}	$E\,\Sigma_\alpha$	$E\,\Sigma_D$	$E\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha$	$E\Sigma_\gamma - \Sigma_\alpha$
XVIII		55—56°	0,876	1,505	+0,38	+0,38	+18 %	+18 %
XIX		78—80°	0,873	1,503	+0,43	+0,42	+15 %	+17 %
XX		91—93°	0,883	1,509	+0,41	+0,41	+18 %	+20 %
XXI		108°	*0,921*[1]	*1,529*[1]	+0,41	*+0,41*	+19 %	—

[1]) Diese Werte sind unsicher, da sie durch eine starke Extrapolation gewonnen sind.

Digitized by Google

In *physikalischer* Beziehung unterscheiden sich, wie sofort in die Augen fällt, die Semibenzole von den isomeren Benzolen hauptsächlich durch ihre weit größere *Mol-Refraktion* und *-Dispersion.* Selbst die nicht ganz reinen Präparate XIV—XVII lassen dies noch deutlich erkennen. Die *Brechungsindices* beider Reihen von Verbindungen sind allerdings nicht wesentlich voneinander verschieden, aber da die Semibenzole eine geringere *Dichte* besitzen als ihre Isomeren, muß ihr molekulares Brechungsvermögen größer sein. Aus beiden folgt, daß die Semibenzole ein lockereres Gefüge haben als die aromatischen Kohlenwasserstoffe, was ohne weiteres verständlich ist. Im einzelnen sind die Unterschiede in den Dichten der aromatischen und der isomeren hydroaromatischen Verbindungen recht ungleich, denn während der Dichteunterschied zwischen X und XVIII, sowie zwischen XI und XIX recht beträchtlich ist, schrumpft er zwischen XII und XX auf einen geringen Betrag zusammen. Es hängt dies offenbar damit zusammen, daß in dem Körper XII die gekreuzte Konjugation durch einen Substituenten gestört ist, in den beiden anderen Semibenzolen aber nicht.

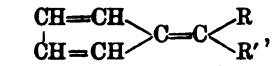
Auch in ihren *Siedepunkten* unterscheiden sich die Semibenzole von den aromatischen Isomeren, denn sie sieden regelmäßig niedriger, wie ein Vergleich der Zahlen von Tabelle II und III zeigt. Jedoch sind die Unterschiede ungleich groß. Man kann daher in manchen Fällen Semibenzolpräparate schon durch einmalige Rektifikation im Vakuum ziemlich vollständig von aromatischen Beimengungen befreien, während in anderen hierzu mehrfach wiederholte Fraktionierung erforderlich ist.

Über die *Spektrochemie* der Semibenzole wäre im einzelnen etwa noch folgendes zu sagen:

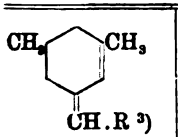
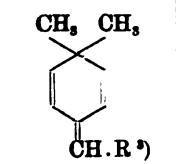
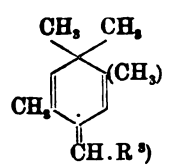
Daß ihre spezifischen Exaltationen verhältnismäßig sehr hoch sind, wurde schon früher hervorgehoben. Sie stimmen in dieser Beziehung ungefähr mit den *Fulvenen*[1]),

[1]) Auwers u. Eisenlohr, Journ. f. prakt. Chem. [2] **84**, 53 (1911).

Digitized by Google

 , überein, mit denen sie auch im Bau eine gewisse Ähnlichkeit besitzen. Die Konjugation im Ring der Fulvene macht sich also optisch nicht bemerkbar, eine Erscheinung, die in cyclischen Systemen des öfteren beobachtet worden ist.[1])

Interessant ist weiter ein Vergleich der Semibenzole mit solchen *hydroaromatischen Kohlenwasserstoffen*, die gleichfalls eine *semicyclische Doppelbindung*, daneben aber nur *eine Doppelbindung im Ring* enthalten.[2])

	$E\,\Sigma_\alpha$	$E\,\Sigma_D$	$E\,\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha$	$E\,\Sigma_\gamma - \Sigma_\alpha$	Bemerkungen
	+1,04	+1,09	+37 %	+41 %	Mittelwerte aus Bestimmungen an zwei Verbindungen (vgl. J. pr. [2] 84, 34 (1911)).
	+1,73	+1,80	+53 %	+57 %	Mittelwerte aus den Beobachtungen an X und XI.
	+0,95	+0,99	+39 %	+42 %	Mittelwerte aus den Beobachtungen an XII und XIII.

Man sieht, daß durch den Zutritt der zweiten endocyclischen Doppelbindung die Exaltationen des Brechungsvermögens sehr beträchtlich und die des Zerstreuungsvermögens merklich erhöht werden, daß diese Wirkung aber durch einen störenden Substituenten wieder völlig aufgehoben wird. Genaue Analogien hierzu sind bis jetzt nicht bekannt, es scheint sich also hierbei um

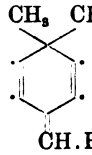
[1]) Vgl. Auwers, diese Annalen 415, 98 (1918).
[2]) Auwers u. Peters, Ber. d. d. chem. Ges. 43, 3076 (1910).
[3]) R = Wasserstoff oder Methyl.

Digitized by Google

Verhältnisse zu handeln, die für diese Verbindungen charakteristisch sind.

Natürlich haben wir uns die Frage vorgelegt, ob die beobachteten Erscheinungen der Wirklichkeit entsprechen, oder ob etwa ungenügende Reinheit der Präparate mitsprechen könnte. Indessen boten die Proben der vier ersten Verbindungen von Tabelle II, die zur Untersuchung gelangten, alle Gewähr für vollkommene Einheitlichkeit, und die gute Übereinstimmung der jeweils zusammengehörigen Bestimmungsreihen ist eine weitere Bestätigung dafür. Zudem lassen auch die weniger reinen Präparate der Körper XIV—XVI den gleichen Einfluß des störenden Substituenten deutlich erkennen. Auffallend niedrig sind nur die Exaltationen des letzten Körpers der Tabelle (XVII); da er aber aus einem bereits stark zersetzten Carbinol dargestellt wurde, hat das Präparat möglicherweise etwas aromatisches Umlagerungsprodukt enthalten.

Bei den entsprechenden *chlorhaltigen* Semibenzol-



derivaten sind die Exaltationen trotz der gleichartigen Struktur wesentlich niedriger, auch macht sich dort ein Einfluß störender Substituenten nicht bemerkbar.[1]) Es wurde jedoch bereits früher[2]) darauf hingewiesen, daß wahrscheinlich keine von diesen Verbindungen in vollkommen reinem Zustand erhalten worden ist, da keine von ihnen durch Destillation im Vakuum oder sonstwie gereinigt werden konnte. Den Beobachtungen an diesen Körpern kann daher nur minderes Gewicht beigelegt werden.

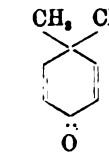
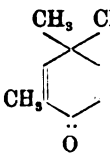
Aber auch zu den *gechlorten Stammketonen* stehen die Semibenzolkohlenwasserstoffe spektrochemisch in

[1]) Auwers u. Eisenlohr, Journ. f. prakt. Chem. [2] 84, 51ff. (1911).

[2]) Vgl. z. B. Ber. d. d. chem. Ges. 44, 1599f. (1911).

Digitized by Google

einem eigentümlichen Gegensatz. Bisher waren nur von den beiden einfachsten Vertretern dieser Ketone, den aus o- und p-Kresol erhältlichen Verbindungen, die optischen Daten bekannt. Um den Einfluß störender Substituenten bei diesen Substanzen kennen zu lernen, haben wir das entsprechende Derivat des *as.* m-Xylenols optisch untersucht und stellen hier die gefundenen Werte mit denen seines niedrigeren Homologen zusammen.

	$E\,\Sigma_\alpha$	$E\,\Sigma_D$	$E\,\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha$	$E\,\Sigma_\gamma - \Sigma_\alpha$
	+0,65	+0,69	+29 %	+30 % [1]
	+0,85	+0,87	+31 %	+34 %

Man sieht erstens, daß die Exaltationen dieser Körper mit ungestörter Konjugation weit geringer sind als die der halogenfreien Semibenzolderivate, und zweitens, daß bei den Ketonen der störende Substituent die entgegengesetzte Wirkung ausübt wie bei jenen Kohlenwasserstoffen, denn durch seinen Eintritt werden die Überschüsse im Brechungsvermögen nicht verringert, sondern ein wenig gesteigert, so daß die Exaltationen der Semibenzole und Ketone mit gestörter Konjugation nur wenig voneinander abweichen.

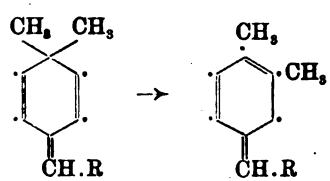
Wir gehen hier auf diese bemerkenswerten Verhältnisse nicht weiter ein, da sie im Zusammenhang mit anderen auffallenden spektrochemischen Beobachtungen stehen und zu ihrer Aufklärung weitere Untersuchungen

[1] Journ. f. prakt. Chem. [2] 84, 70 (1911).

Digitized by Google

erforderlich sind. Praktisch ergab sich für uns aus diesen Tatsachen jedoch die Notwendigkeit, die Struktur der Semibenzolkohlenwasserstoffe, die bisher lediglich aus ihrer Bildungsweise abgeleitet war, durch besondere Versuche chemisch zu beweisen.

Daß aus den halogenfreien Carbinolen durch Wasserabspaltung zunächst tatsächlich Verbindungen mit einer semicyclischen Doppelbindung und zwei weiteren, symmetrisch zu ihr angeordneten Äthylenbindungen entstehen, kann zwar nicht ernstlich bezweifelt werden; es war aber denkbar, daß nachträglich eine Atomverschiebung im Sinne der Formeln



eintreten könne, zumal ähnliche Vorgänge bei einfach ungesättigten hydroaromatischen Kohlenwasserstoffen bereits beobachtet worden sind.[1]) Derartige Substanzen, die in ihren Molekülen statt einer gekreuzten eine *gehäufte* Konjugation enthalten, würden sehr beträchtliche Exaltationen erwarten lassen, und ebenso würde die Wirkung des störenden Substituenten bekannten Gesetzmäßigkeiten entsprechen. Vom chemischen Standpunkt aus konnte allerdings die Existenzfähigkeit derartiger Gebilde fraglich erscheinen.

Um die Konstitution der Semibenzolkohlenwasserstoffe einwandfrei zu beweisen, wählten wir den Weg des *oxydativen Abbaus* und benutzten dazu das *1,1-Dimethyl-4-äthencyclohexadien-(2,5)* (XI), weil dieses Semibenzol verhältnismäßig am beständigsten ist. Bei der Behandlung des Körpers mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung entstanden in guter Ausbeute *Di-*

[1]) Vgl. Meerwein, diese Annalen **405**, 129 (1914).

Digitized by Google

methylmalonsäure und *Essigsäure.* Damit war das Vorhandensein einer *gem.* Dimethylgruppe in dem Ausgangsmaterial dargetan und die Richtigkeit der ursprünglich angenommenen symmetrischen Formel für den Körper bewiesen. Da das gleichartige physikalische und chemische Verhalten der Semibenzole eine verschiedenartige Konstitution der einzelnen Glieder ausschließt, darf damit zugleich die Struktur der ganzen Körpergruppe als festgestellt gelten.

Wie die Semibenzole als stark ungesättigte Verbindungen leicht oxydiert werden, so nehmen sie auch *mit Leichtigkeit Wasserstoff auf*, doch gelang es mit den beschränkten Substanzmengen, die für diese Versuche verwendet werden konnten, nicht, einheitliche Hydrierungsprodukte zu gewinnen.

Auch einheitliche *Bromide* konnten nicht erhalten werden, da schon in einem frühen Stadium der Reaktion die Abspaltung von Bromwasserstoff beginnt, dadurch aber das noch vorhandene Ausgangsmaterial sofort zum Benzolderivat isomerisiert wird (vgl. unten).

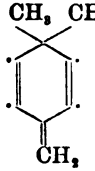
Umlagerung in Kohlenwasserstoffe der Benzolreihe.

Die interessanteste Seite im *chemischen* Verhalten der Semibenzole ist ihre *Umlagerung in die Homologen des Benzols.*

Bei der früheren Untersuchung des Kohlenwasserstoffs der Semibenzolreihe blieb die Frage noch offen, ob diese Substanzen, wenn sie einmal gebildet sind, in Benzolderivate umgewandelt werden können; denn das Pseudocumol, das bei der Darstellung des *1,1-Dimethyl-4-methencyclohexadien-(2,5)* (X) erhalten wurde, konnte *neben* diesem Kohlenwasserstoff bei der Abspaltung von Wasser aus dem Carbinol entstanden sein.

Es hat sich nun ergeben, daß jener Zweifel nicht unbegründet war, denn die *Kohlenwasserstoffe* der Semibenzolreihe verhalten sich hinsichtlich ihrer Umlagerungs-

Digitized by Google

fähigkeit durchaus verschieden von den früher eingehend untersuchten *Dichlorderivaten*[1]) 

.

Die meisten von diesen Chlorverbindungen lagern sich schon bei Temperaturen unter 100° stürmisch in aromatische Verbindungen um; nur in seltenen Fällen muß man zum Einleiten der Reaktion etwas über 100° erwärmen. Ein halogenhaltiges Semibenzol, das durch Erhitzen überhaupt nicht in einen aromatischen Körper übergeführt werden kann, ist bis jetzt noch nicht bekannt geworden.

Die *halogenfreien Semibenzole lagern sich dagegen unter dem Einfluß der Wärme anscheinend überhaupt nicht in aromatische Kohlenwasserstoffe um*; wenigstens konnte in den bisher untersuchten Fällen deren Bildung *nicht* nachgewiesen werden. Allerdings erleiden auch die einfachen Semibenzole bei längerem Erwärmen auf höhere Temperatur eine Veränderung, doch besteht diese, wie bereits früher in einem Fall festgestellt wurde, lediglich in einer allmählichen *Polymerisation*. Bei manchen Verbindungen geht dieser Prozeß so langsam vor sich, daß nach einstündigem Erhitzen das Ausgangsmaterial kaum verändert ist. Es ist demnach nicht verwunderlich, daß die meisten Semibenzole im Vakuum unverändert übergehen. Ja, von den beständigsten unter ihnen lassen sich sogar kleinere Mengen unter gewöhnlichem Druck destillieren, was im Hinblick auf das ganz andersartige Verhalten der Chlorderivate überrascht.

Als Beispiele seien einige Versuche mit dem *1,1-Dimethyl-4-äthencyclohexadien-(2,5)* (XI) angeführt. Als eine Probe des Körpers 1 Stunde auf 150—160° erhitzt worden war, hatte sich eine geringe Menge polymerisiert,

[1]) Vgl. besonders diese Annalen **352**, 219 (1907).

Digitized by Google

die Hauptmenge zeigte nach der Rektifikation im Vakuum die unten verzeichneten Exaltationen. Ferner wurde eine Probe eines anderen Präparates unter gewöhnlichem Druck destilliert, wobei es bei 175—178° überging. Die Exaltationen des Destillates werden gleichfalls hier mitgeteilt.

	$E\Sigma_\alpha$	$E\Sigma_D$	$E\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha$	$E\Sigma_\gamma - \Sigma_\alpha$
as. Äthyl-o-zylol . . .	+0,43	+0,42	+15%	+17%
Semibenzol, rein . . .	+1,60	+1,66	+53%	+57%
Semibenzol, auf 150—160° erhitzt	+1,47	+1,54	+49%	+53%
Semibenzol, destilliert .	+1,45	+1,51	+48%	+52%

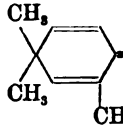
Die Zahlen zeigen, daß bei diesen Versuchen das Semibenzol im wesentlichen unverändert geblieben war; bei der Destillation hatte bestimmt keine Umlagerung oder Polymerisation stattgefunden, denn das für diesen Versuch verwendete, nicht vollkommen reine Präparat des Semibenzols besaß vor der Destillation fast genau dieselben $E\Sigma$-Werte.

Die *Umlagerung in aromatische Kohlenwasserstoffe*, die somit durch Wärme nicht erzwungen werden kann, tritt dagegen mit größter Leichtigkeit unter dem Einfluß von *Säuren* ein. Am kräftigsten wirken hierbei nach den bisherigen Versuchen die *Halogenwasserstoffsäuren*. Fügt man zu der Lösung eines Semibenzols in etwa dem doppelten Volumen Eisessig einen Tropfen konzentrierter Salzsäure, so zeigt eine alsbald beginnende Temperaturerhöhung den Eintritt der Umlagerung an, und der in Eisessig weniger lösliche aromatische Kohlenwasserstoff scheidet sich als ölige Schicht über dem Eisessig ab.

Zu den gleichen Umwandlungsprodukten gelangt man, wenn man nicht von den Semibenzolen, sondern von den zugehörigen *Carbinolen* ausgeht. Löst man einen dieser tertiären Alkohole in Eisessig, so spaltet er zunächst ohne merkliche Wärmetönung Wasser ab; setzt man darauf Salzsäure hinzu, so erfolgt die Umlagerung des Semibenzols. Man kann daher auch unreine Präparate von Carbinolen oder Semibenzolen, welche Gemische

Digitized by Google

beider Komponenten darstellen, für das Studium dieser Umlagerungsreaktion benutzen.

Vergleichende Versuche, bei denen etwa 1 ccm Semibenzol oder Carbinol in etwa 2 ccm Eisessig mit 1 Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt wurde, lehrten, daß die Umlagerungsgeschwindigkeit der einzelnen Semibenzole, wie zu erwarten war, verschieden groß ist, denn die beobachtete Temperaturerhöhung war in den einzelnen Fällen recht ungleich. Beispielsweise steigt die Temperatur von etwa 15° auf 60—70°, wenn sich 1 ccm des einfachsten Semibenzols, des *1,1-Dimethyl-4-methencyclohexadiens* (X) umlagert, während bei den meisten Homologen das Gemisch sich nur auf 30° oder höchstens 40° erwärmt. Noch stärker als bei dem eben genannten Semibenzol ist die Neigung zur Umlagerung beim *1,1,3-Trimethyl-4-methencyclohexadien-(2,5)*,  , das bisher überhaupt nicht isoliert werden konnte, da es sich schon beim Versuch der Darstellung in das isomere *Durol* verwandelt. Es findet daher auch eine sehr lebhafte Wärmeentwicklung statt, wenn man das zugehörige *1,1,3,4-Tetramethylcyclohexadien-(2,5)-ol-(4)* in Eisessig mit Salzsäure versetzt.

Beziehungen zwischen Umlagerungsbestreben und Konstitution dieser Verbindungen scheinen vorhanden zu sein (vgl. unten). Hier sei nur vorweg bemerkt, daß im allgemeinen die höheren Homologen beständiger sind als die niedrigeren. Vor allem gilt dies für die *Äthen*derivate im Verhältnis zu den *Methen*verbindungen. Besonders deutlich zeigt sich dies beim *1,1,3-Trimethyl-4-äthencyclohexadien-(2,5)*, denn diese Substanz geht erst bei längerem Erwärmen mit Säure vollständig in einen aromatischen Kohlenwasserstoff über, während das entsprechende Methenderivat, wie eben bemerkt, äußerst labil ist.

Digitized by Google

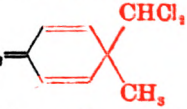
Man könnte geneigt sein, die umlagernde Wirkung der Halogenwasserstoffsäuren darauf zurückzuführen, daß sich zunächst ein oder mehrere Moleküle der Säure an das Semibenzol anlagern und darauf in anderer Weise wieder abspalten, wodurch gleichzeitig Verschiebungen von Atomen und Atomgruppen im Molekül hervorgerufen werden. Zugunsten dieser Auffassung könnte die Tatsache angeführt werden, daß die auf diesem Wege erhaltenen aromatischen Kohlenwasserstoffe im Rohzustand regelmäßig halogenhaltig sind und erst durch längeres Siedenlassen über Natrium völlig rein erhalten werden. Aber gerade diese Beständigkeit der beigemengten Halogenverbindungen spricht dafür, daß sie *nicht Zwischen-, sondern Nebenprodukte* der Reaktion darstellen. Auch die Tatsache, daß sich in manchen Fällen die Umlagerung in wenigen Sekunden abspielt, deutet darauf hin, daß die Säuren lediglich *katalytisch* wirken. Ob man dabei annehmen will, daß zunächst eine sehr geringe Menge eines Anlagerungsproduktes entsteht, und dessen Zerfall die Hauptreaktion auslöst, steht dahin; eine bestimmte Entscheidung hierüber ist jedenfalls auf Grund der bisherigen Beobachtungen nicht möglich.

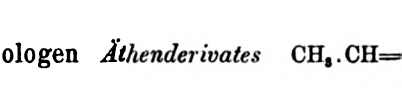
So bequem die beschriebene Umlagerungsmethode ist, wenn es sich nur um vergleichende Versuche handelt, empfiehlt sie sich doch wegen der Bildung jener chlorhaltigen Nebenprodukte weniger für die Gewinnung reiner Präparate der Benzolderivate. Hierfür verwendet man zweckmäßiger *Schwefelsäure*. Schon bei der Darstellung der Semibenzole durch Schütteln der tertiären Alkohole mit eiskalter verdünnter Schwefelsäure werden wohl in allen Fällen gewisse Mengen der aromatischen Kohlenwasserstoffe als Nebenprodukte entstehen, doch läßt sich ihre Bildung meist durch passende Arbeitsweise auf ein geringes Maß beschränken. Nur besonders empfindliche Semibenzole, wie das oben erwähnte hydroaromatische Isomere des *Durols*, gehen dabei trotz aller Vorsichtsmaßregeln schon in den aromatischen Kohlenwasserstoff

Digitized by Google

über. Allgemein geschieht dies, wenn man stärkere Schwefelsäure anwendet oder das Gemisch erwärmt. Am besten aber löst man wiederum das Semibenzol oder Carbinol in *Eisessig* auf und läßt 70prozentige Schwefelsäure hinzutropfen. Bei einfacheren Semibenzolen ist die Umlagerung unter freiwilliger, mehr oder weniger lebhafter Erwärmung bald beendet; bei den höheren Homologen empfiehlt es sich, nachdem die erste heftige Reaktion vorüber ist, das Gemisch noch einige Zeit zu erwärmen. Bei hochalkylierten Substanzen muß man mitunter zum Schluß sogar kräftig erhitzen, um die Umwandlung vollständig durchzuführen.

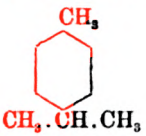
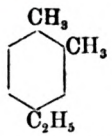
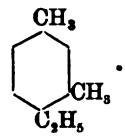
Nachdem die Umlagerungsfähigkeit der Semibenzole erkannt war, galt es festzustellen, *ob sich diese Reaktion nach einem bestimmten Schema vollzieht*, d. h. ob das aus der *gem.* Dimethylgruppe abwandernde Methyl stets denselben Platz im Molekül des entstehenden aromatischen Kohlenwasserstoffs aufsucht.

Es ist bereits früher mitgeteilt worden, daß bei der Darstellung des bisher einfachsten Semibenzols (X) als Nebenprodukt nicht p-Methyläthylbenzol entsteht, wie nach dem Verhalten des Chlorderivates  zu erwarten gewesen wäre, sondern *Pseudocumol.* Auch das fertige *1,1-Dimethyl-4-methencyclohexadien* (X) liefert bei der Umlagerung durch Säuren ausschließlich diesen Kohlenwasserstoff, der durch sein charakteristisches *Trinitroderivat* vom Schmelzp. 185° identifiziert wurde. Ob dabei das wandernde Methyl in die *ortho-* oder in die *meta*-Stellung zu seinem ursprünglichen Platz tritt, läßt sich natürlich in diesem Fall nicht sagen.

Um diese Frage zu entscheiden, wurde die Umlagerung des homologen *Äthenderivates*  (XI)

Digitized by Google

untersucht. Aus diesem Körper konnten folgende drei Kohlenwasserstoffe entstehen:

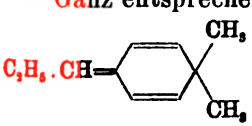




Das Cymol siedet bei 175—176°; für die beiden Äthylxylole werden in der Literatur die Siedepunkte 189°[1]) und 184°[2]) angegeben. Da das Umlagerungsprodukt bei 186—187° siedete, mußte es eines der beiden Xylolderivate sein. Die weitere Untersuchung ergab, daß die Substanz das *as. Äthyl-o-xylol* war, denn es stimmte in seinen physikalischen Konstanten mit einem durch Reduktion von Aceto-o-xylol dargestellten Vergleichspräparat gut überein.

	Siedep.	d_4^{20}	n_D^{20}
Umlagerungsprodukt	186—187°	0,873	1,5026
as. Äthyl-o-xylol	186—187°	0,874	1,5030

Zur völlig sicheren Identifizierung wurden beide Substanzen in ihre *Trinitroderivate* übergeführt, die beide für sich und gemischt bei 124° schmolzen.

Ganz entsprechend verwandelte sich das *Propenderivat*



(XIV) bei seiner Umlagerung in das *as. Propyl-o-xylol*, von dem gleichfalls zum Vergleich ein Präparat durch Reduktion des bisher noch nicht bekannten *as. Propionyl-o-xylols* dargestellt wurde.

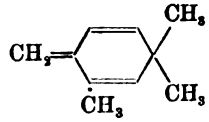
	Siedep.	d_4^{20}	n_D^{20}
Umlagerungsprodukt	201—203°	0,864	1,4954
as. Propyl-o-xylol	202—204°	0,871	1,5007

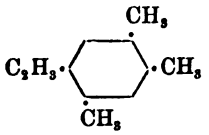
Bei vorsichtiger Bromierung lieferten beide Substanzen *Tribromderivate*, von denen das aus dem Umlagerungsprodukt gewonnene Präparat bei 42°, das

[1]) Armstrong u. Müller, Ber. d. d. chem. Ges. 16, 2258 (1383).
[2]) Ernst u. Fittig, diese Annalen 139, 193 (1866).

Digitized by Google

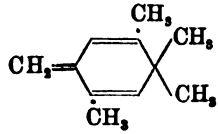
andere bei 44—45° schmolz; der Schmelzpunkt eines Gemisches lag bei 43—44°. Auch entstand aus beiden Proben des Kohlenwasserstoffs durch energische Bromierung unter Abspaltung des Propyls *Tetrabrom-o-xylol.*

Daß das Semibenzol  sich sofort nach seiner Entstehung in *Durol* umlagert, wurde bereits erwähnt.

Danach war zu erwarten, daß die entsprechende *Äthenverbindung* sich zum *sym. Äthylpseudocumol*  isomerisieren würde. Dies trifft zu, wie die folgende Zusammenstellung beweist.

	Siedep.	d_4^{20}	n_D^{20}	Schmelzp. des Dibromderivates
Umlagerungsprodukt .	210—211°	0,887	1,5111	55°
sym. Äthylpseudocumol	211°	0,883	1,5086	55°

In allen bisher besprochenen Fällen verlief die Umlagerung sehr glatt und führte zu einheitlichen Kohlenwasserstoffen, die höchstens geringe Beimengungen fremder Substanzen enthielten. Dagegen war dies in den folgenden Beispielen nicht in gleichem Maße der Fall.

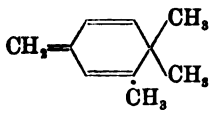
Nach Analogien sollte sich das Semibenzol  (XIII) in *Pentamethylbenzol* umlagern. Tatsächlich entstand diese Verbindung, die an ihrem Schmelzpunkt und durch Vergleich mit einem Präparat der Sammlung leicht identifiziert werden konnte, als Hauptprodukt. Daneben enthielt jedoch das Reaktionsprodukt einen flüssigen Kohlenwasserstoff von niedrigerem Siedepunkt, dessen Natur wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge nicht aufgeklärt werden konnte.

Digitized by Google

Die Umlagerung war in diesem Fall durch Salzsäure bewirkt worden. Möglicherweise verläuft der Prozeß bei Anwendung der milder wirkenden Schwefelsäure glatter, doch verzichteten wir auf die Wiederholung des Versuchs, da es sich nur um ein Nebenprodukt handelte.

Bei der Umlagerung des homologen *Äthenderivates* (XVI) wurde ein inkonstant von 215—230° siedendes Produkt erhalten, das noch ungesättigte Bestandteile enthielt. Es war damals noch nicht erkannt worden, daß man zur völligen Umlagerung mancher Semibenzole zum Schluß das Gemisch erwärmen muß, und aus diesem Grund war anscheinend die Reaktion unvollständig geblieben. Wegen der Kostspieligkeit des Ausgangsmaterials haben wir auch in diesem Fall von einer Wiederholung des Versuchs abgesehen.

Die Untersuchung der Umlagerung des Semibenzols

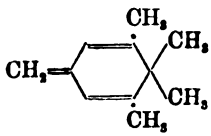


(XV) wurde dadurch sehr erschwert, daß diese Substanz sich im Gegensatz zu den meisten anderen Semibenzolen in Berührung mit Säuren rasch weitgehend polymerisiert. Auch das zugehörige Carbinol liefert mit Säuren zum größten Teil harzige, hochsiedende Produkte. Man erhielt daher nur eine geringe Menge einer Substanz von den Eigenschaften aromatischer Kohlenwasserstoffe, die bei 192—196° siedete. Prehnitol, das bei 204° siedet, und das bei 186—187° siedende *as.* Äthyl-o-xylol werden, nach jenem Siedepunkt zu urteilen, nicht in größerer Menge in jenem Produkt enthalten gewesen sein. Auch eine stärkere Beimengung von Durol (Siedep. 190°) erscheint ausgeschlossen, da die Substanz dann bei kräftiger Abkühlung wenigstens zum Teil hätte erstarren müssen. So darf man es denn als einigermaßen wahrscheinlich ansehen, daß das fragliche Produkt im wesentlichen aus dem flüssigen *Isodurol* bestand, das bei 196° siedet. Dazu stimmt die Tatsache,

Digitized by Google

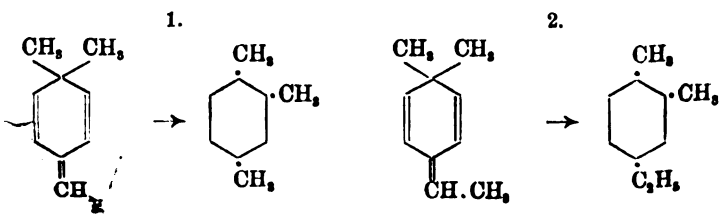
daß der Körper ein *Dibromderivat* lieferte, das nach zweimaligem Umkrystallisieren — zu weiteren Krystallisationen reichte die Menge nicht aus — bei 195° schmolz und in siedendem Alkohol leichter löslich war als ein ähnlich schmelzendes Präparat von Dibromdurol. Doch enthielt das vermutliche Isodurol eine Verunreinigung, denn das Nitrierungsprodukt, das allerdings wegen der geringen Substanzmenge gleichfalls nur zweimal umkrystallisiert werden konnte, schmolz unscharf zwischen 100° und 110°, während reines Dinitroisodurol bei 156° schmelzen soll.

Auch bei der Umlagerung der Verbindung

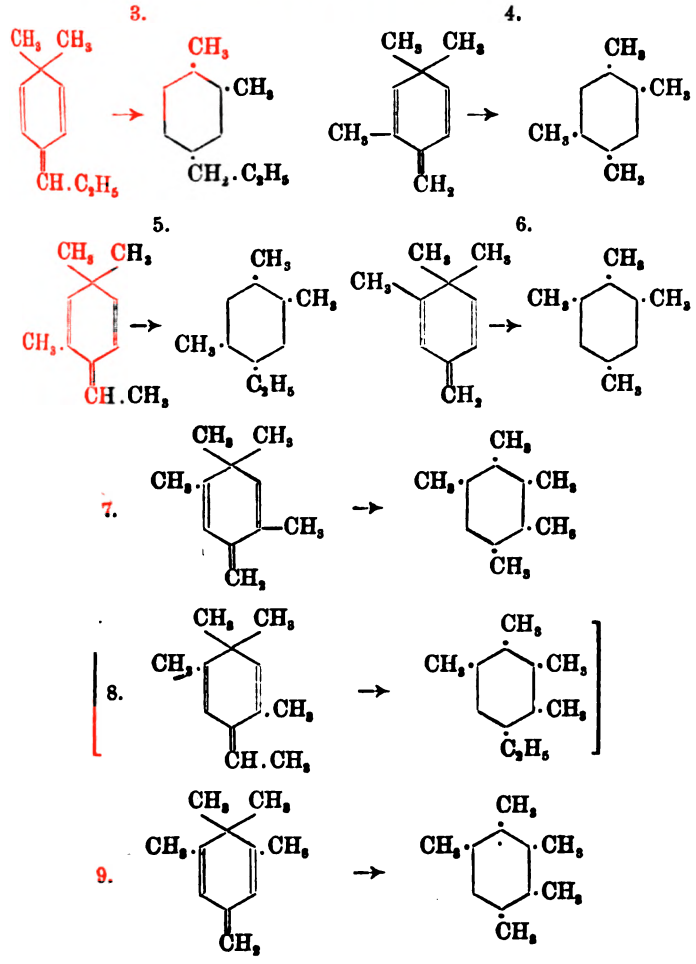


(XVII) wurde kein ganz einheitliches Produkt gewonnen, denn die Substanz siedete von 210° bis 230° und enthielt, wie die Prüfung mit Brom und Kaliumpermanganat zeigte, noch eine hydroaromatische Beimengung, obwohl man das Gemisch von Semibenzol, Eisessig und Schwefelsäure $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbade und dann noch $^1/_4$ Stunde bis zum Sieden erhitzt hatte. Da das Produkt in einer Kältemischung erstarrte, bei Zimmertemperatur aber wieder schmolz, war anzunehmen, daß es ein Gemisch von *Pentamethylbenzol* und unverändertem Ausgangsmaterial war. In der Tat ließ sich jener aromatische Kohlenwasserstoff in Gestalt seiner Pikrinsäureverbindung leicht abscheiden und konnte aus dieser auch in Substanz isoliert werden.

Im folgenden stellen wir die untersuchten Übergänge nochmals übersichtlich zusammen.



Digitized by Google



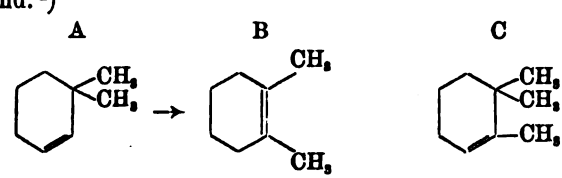
In den ersten 5 Beispielen vollzieht sich die Umlagerung ohne wesentliche Bildung von Nebenprodukten in dem angegebenen Sinne; in den Fällen 6, 7 und 9 dürfen die aufgeführten Kohlenwasserstoffe gleichfalls als Hauptprodukte der Umlagerung angesehen werden; in Beispiel 8 steht der Beweis für den angenommenen Reaktionsverlauf noch aus.

Aus diesen Beobachtungen folgt, daß bei der Umlagerung *ein Methyl der gem. Gruppe an ein benachbartes*

Digitized by Google

Kohlenstoffatom des Kerns tritt; nur wenn beide *ortho*-Stellungen besetzt sind, wandert es zu einem *meta*-ständigen Kohlenstoffatome (Fall Nr. 9). Können durch den Übertritt des Methyls in die *ortho*-Stellung isomere Kohlenwasserstoffe entstehen, so bildet sich in der Hauptsache die Verbindung, in deren Molekül die Substituenten möglichst gleichförmig am Kern verteilt sind (vgl. Nr. 4 und 5). Ob daneben in untergeordnetem Maße isomere Substanzen entstehen, ist fraglich. Substituenten in *ortho*-Stellung zur *gem.* Dimethylgruppe erhöhen die Beständigkeit der Semibenzole, denn während die ersten fünf Verbindungen der obigen Zusammenstellung sich sämtlich unter dem Einfluß von Salz- oder Schwefelsäure in Eisessig ohne äußere Wärmezufuhr glatt umlagern, bleibt in den Fällen 6—8 die Reaktion unter den gleichen Bedingungen leicht unvollständig, und das zweifach *ortho*-substituierte Semibenzol (Nr. 9) geht selbst bei kräftiger Erwärmung nur langsam in das aromatische Isomere über.

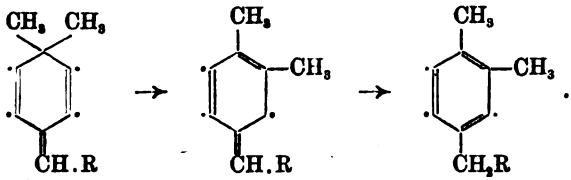
Bei einfach ungesättigten hydroaromatischen Kohlenwasserstoffen hat man Ähnliches beobachtet, denn Verbindungen vom Typus A lagern sich sofort — neben anderen Veränderungen — in die isomeren Substanzen B um[1]), während die Homologen von der Form C beständig sind.[2])



Man kann daraus vielleicht schließen, daß auch bei der Umlagerung von Semibenzolen in echte Benzolderivate diese Atomverschiebung die erste Phase der Reaktion bildet und der normale Verlauf des ganzen Prozesses durch folgende Formelbilder wiedergegeben wird:

[1]) **Meerwein, diese Annalen 405, 133 f. (1914).**
[2]) **Auwers u. Lange, diese Annalen 409, 157 (1915).**

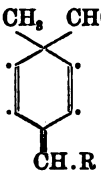
Digitized by Google



Ist eine doppelte Möglichkeit für die erste Verschiebung gegeben, so wird die Umlagerung am leichtesten stattfinden; umgekehrt am schwersten, wenn sie durch Substituenten in beiden *ortho*-Stellungen unmöglich gemacht ist, und eine andere Art von Umformung des Moleküls erzwungen werden muß.

Wie man sich auch im einzelnen den Verlauf der Isomerisierung von Kohlenwasserstoffen der Semibenzolreihe zu aromatischen Verbindungen vorstellen mag, so bietet doch die Reaktion als solche nichts Auffälliges, denn sie ist nur ein weiteres Beispiel für das allgemein anzutreffende Bestreben hydroaromatischer Substanzen, wenn möglich, in die stabileren Benzolderivate überzugehen, und die Verschiebungen, die zu diesem Zweck in den Molekülen der Semibenzole eintreten, sind verständlich und haben Analogien.

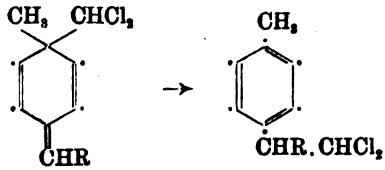
Um so merkwürdiger erscheint nach diesen Feststellungen das abweichende Verhalten der zuerst aufgefundenen *chlorierten Semibenzole* vom Schema



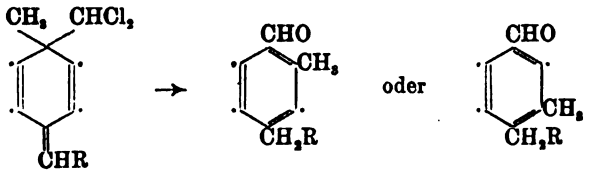
Daß diese Körper im Gegensatz zu den Semibenzolkohlenwasserstoffen in der Regel schon durch gelindes Erwärmen in aromatische Verbindungen übergeführt werden können, läßt sich allerdings ohne allzu großen Zwang durch die Annahme einer lockereren Bindung der Gruppe $-CHCl_2$ erklären. Schon schwerer zu verstehen ist, daß diese Halogenderivate nicht wie die Stammkörper durch geringe Mengen von Säuren umgelagert werden, denn etwa eine Erschwerung der primären An-

Digitized by Google

lagerung von Säuren durch das stärker raumerfüllende Radikal annehmen zu wollen, ist nicht angängig, da beispielsweise die entsprechend gebauten chlorhaltigen Ketone mit größter Leichtigkeit Halogene addieren. Am sonderbarsten ist aber die Tatsache, daß bei der Umlagerung der gechlorten Semibenzole die wandernde Gruppe $—CHCl_2$ nicht am Kern verschoben wird, sondern in die *para*-ständige Seitenkette springt, denn unabhängig von der Natur des Substituenten R ist bisher ausnahmslos beobachtet worden, daß die Isomerisierung jener Körper nach dem Schema



erfolgt; auch dann, wenn in jener Seitenkette kein Wasserstoff vorhanden ist, so daß bei der Umlagerung ein tertiäres Radikal entsteht, gegen dessen Bildung ein sterischer Widerstand denkbar wäre. Nur wenn man die chlorierten Semibenzole in konzentrierter Schwefelsäure auflöst, erleiden sie eine ähnliche Umformung wie die Stammkörper, denn nach den bisherigen Beobachtungen verläuft unter diesen Bedingungen die Umlagerung im Sinne der Formeln



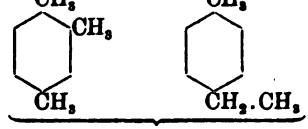
es entstehen also unter Wanderung des Methyls kernhomologe Aldehyde.

Ob etwa bei der Umlagerung der halogenfreien Semibenzole nicht ausschließlich ein Methyl am Kern verschoben wird, sondern ob daneben auch ein Übertritt von Methyl an die semicyclisch gebundene Seitenkette

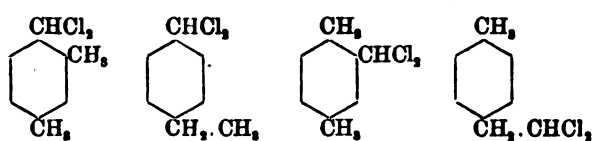
Digitized by Google

erfolgt, ist eine Frage, die wir vorläufig nicht beantworten können, da, wie bemerkt, die Natur der den Hauptprodukten in einzelnen Fällen anhaftenden Beimengungen nicht festgestellt werden konnte. Bereits jetzt läßt sich aber sagen, daß es sich dabei höchstens um eine unbedeutende Nebenreaktion handeln könnte; der charakteristische Unterschied in der Umlagerung der halogenfreien und halogenhaltigen Semibenzolderivate ist zweifellos vorhanden.

Bei jeder freiwillig verlaufenden Umlagerung wird das Gebilde entstehen, in dem der unter den gegebenen Bedingungen denkbar vollständigste Ausgleich der Affinitätskräfte im Molekül stattfindet und nach Möglichkeit günstige räumliche Verhältnisse bestehen. Zwischen den Formeln der Kohlenwasserstoffe A wird in dieser Hinsicht kein großer

A 

Unterschied sein, daher wird sich aus dem Semibenzol diejenige Verbindung bilden, die aus der einfachsten Umformung des Moleküls hervorgeht, d. h. das Pseudocumol. Andererseits ist bekannt, daß negative Gruppen, die an einem aromatischen Kern haften, leichter abgespaltet werden können als solche, die sich an einer aliphatischen Kette befinden. Von den vier unter B

B 

verzeichneten denkbaren Umwandlungsprodukten des einfachsten gechlorten Semibenzols wird also die letzte Verbindung diejenige sein, in der die Gruppe —$CHCl_2$ am festesten haftet, in der also die Valenzen nach Möglichkeit abgesättigt sind. Ob dieser Versuch, das verschiedene Verhalten der beiden Arten von Semibenzol-

Digitized by Google

derivaten bei der Umlagerung zu erklären, das Richtige trifft, lassen wir dahingestellt sein; zurzeit erscheint uns aber diese Betrachtung allein imstande, jenen merkwürdigen Unterschied verständlich zu machen.

Von einigen chlorierten Semibenzolen sind seinerzeit die *Verbrennungswärmen* bestimmt und mit denen ihrer Umlagerungsprodukte verglichen worden.[1]) Es ergab sich damals, daß bei den Semibenzolderivaten die auf ein Mol bezogene Verbrennungswärme um etwa 10 Kal. größer ist, doch ist dieser Wert unsicher, da jene chlorhaltigen Verbindungen nicht in völlig reinem Zustand gewonnen und erst einige Tage nach ihrer Darstellung verbrannt werden konnten. Für die Kohlenwasserstoffe der Semibenzolreihe liegen die Verhältnisse insofern günstiger, als diese Substanzen vollkommen rein erhalten werden können und sich einige von ihnen im Laufe von 24 Stunden nicht merklich verändern. Die interessante Frage, wie groß der Energieunterschied zwischen Semibenzolen und Benzolen ist, wird sich daher hoffentlich beantworten lassen.

Experimenteller Teil.

Darstellung der Ausgangsmaterialien.

Als Ausgangsmaterialien dienten die hydroaromatischen chlorhaltigen Ketone, die bei der Einwirkung von Chloroform und Natronlauge auf gewisse Phenole entstehen. Die Darstellung dieser Verbindungen aus *p-Kresol* und *Pseudocumenol* geschah nach den früher[2]) gegebenen Vorschriften; dagegen wurde die Bereitung der Ketone aus *as. o-Xylenol* und *as. m-Xylenol* etwas verbessert. Man verfuhr zunächst nach den Angaben von Auwers und Keil, ließ jedoch die Umsetzung der Phenole mit Chloroform und Alkali, statt bei 70°, bei 80° und gegen Ende der Reaktion bei 90—100° vor sich

[1]) Diese Annalen **352**, 267 ff. (1907).

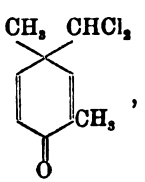
[2]) Auwers u. Keil, Ber. d. d. chem. Ges. **35**, 4212, 4216 (1902); diese Annalen **352**, 290 (1907).

Digitized by Google

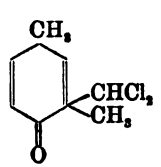
gehen. Darauf trieb man das Reaktionsprodukt nicht mit überhitztem Wasserdampf über, da diese Operation sehr viel Zeit beansprucht, sondern trennte die Chloroformschicht ab und erhitzte die Flüssigkeit — in der Regel wurden die Chloroformschichten von 2—3 Versuchen zu je 100 g Xylenol vereinigt — erst auf dem Wasserbade, zuletzt über freier Flamme, bis das Thermometer 140° zeigte und alles Chloroform sowie der größte Teil des anhaftenden Wassers entfernt waren. Den dicken, braunen Rückstand destillierte man darauf im Vakuum, wobei man zum Schluß kräftig überhitzen mußte, um alles Keton aus den zurückbleibenden harzigen Massen herauszubekommen.

Bei der Darstellung des Ketons aus dem *as. o-Xylenol* goß man das ölige Destillat in verd. Natronlauge, verrieb das erstarrte Produkt mehrfach mit Lauge, trocknete auf dem Wasserbad und destillierte es schließlich nochmals im Vakuum, wobei es in vorzüglicher Reinheit überging. Die Ausbeute schwankte zwischen 30 und 40 Proz. vom Gewicht des angewandten Phenols.

Für die Bereitung des isomeren Ketons aus *as. m-Xylenol* verdünnte man das bei der ersten Rektifikation erhaltene ölige Destillat mit Äther und schüttelte wiederholt mit verd. Natrolauge durch, bis in diese nichts mehr hineinging. Dann verjagte man den Äther und destillierte erneut im Vakuum. Aus dem übergegangenen Öl krystallisierte beim Abkühlen und Kratzen der Hauptteil des gewünschten Ketons (A) aus. Die ölige Mutterlauge bestand, wie bereits früher[1]) vermutet worden war, aus einer Mischung dieses Ketons mit dem isomeren *ortho*-Derivat (B)



A ,



B .

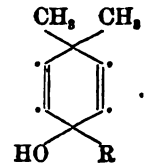
[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 35, 4210 (1902).

Digitized by Google

Durch fortgesetzte Fraktionierung im Vakuum konnte man die Isomeren voneinander trennen, indem sich das *para*-Derivat in den höheren Fraktionen ansammelte, die entweder von selbst oder beim Abkühlen erstarrten.

Die Ausbeute an *para*-Verbindung betrug, wie früher, knapp $^1/_3$ vom Gewicht des angewandten Xylenols. Das isomere Keton entstand regelmäßig nur in geringer Menge; seine Beschreibung soll an anderer Stelle erfolgen.[1])

Darstellung der chlorfreien Carbinole



Die Umsetzung der Ketone mit Magnesiumjodalkylen wurde stets nach den früher[2]) gegebenen Vorschriften durchgeführt.

Auch die Reduktion der chlorhaltigen Carbinole zu den chlorfreien Verbindungen geschah im wesentlichen wie früher.[3]) Dabei stellte sich heraus, daß die besten Ausbeuten an chlorfreiem Carbinol erzielt wurden, wenn man während der Reduktion nicht kühlte, sondern die feuchte ätherische Lösung durch die Einwirkung des Natriumdrahtes sich schwach erwärmen ließ. Nach 24 Stunden unterbrach man die Reaktion, fügte vorsichtig Wasser bis zum Verschwinden des Natriums hinzu, trocknete über Natriumsulfat und destillierte den Äther aus einem 40—50° warmen Bade unter Benutzung eines 15 cm hohen, mit Glasperlen gefüllten Aufsatzes. Zum Schluß rektifizierte man die Carbinole im Vakuum.

Häufig beobachtete man dabei, daß die Fraktion, in der sich das meiste Carbinol befand, mehr oder weniger stark *gelb* gefärbt überging. In manchen Fällen war

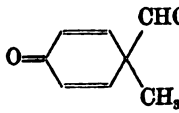
[1]) Ber. d. d. chem. Ges. **53**, 2299 (1920). (Anm. bei d. Korrektur.)

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. **36**, 1868 (1903); **38**, 1705 (1905); diese Annalen **352**, 288 ff. (1907).

[3]) Auwers u. K. Müller, Ber. d. d. chem. Ges. **44**, 1602 (1911).

Digitized by Google

die Färbung so intensiv, daß es von Interesse gewesen wäre, die Natur dieser Beimengung zu ergründen, doch war dies bei den geringen Mengen, um die es sich bei allen diesen Versuchen handelte, ausgeschlossen.

Abkömmlinge des Ketons  .

1,1-Dimethyl-4-methencyclohexadien-(2,5) (X).

Die Darstellung dieses Körpers erfolgte genau in der von Auwers und K. Müller (a. a. O.) angegebenen Weise. Bei der Vakuumdestillation, die ohne Anwendung eines Wasserstoffstroms vorgenommen wurde, fing man unter 20 mm Druck folgende Fraktionen auf:

I. 49—55°. II. 55—60°. III. 60—70°.

Die erste ging bei erneuter Destillation unter dem gleichen Druck bei 43—45° über, wurde optisch untersucht, nochmals destilliert — Siedep.$_{15}$ = 38—40° — und abermals optisch untersucht. Da beide Beobachtungsreihen fast übereinstimmen, geben wir hier nur die letzte wieder (I) und fügen zum Vergleich unter II die Konstanten des reinsten von Auwers und Müller erhaltenen Präparats bei.

I. $d_4^{15,8}$ = 0,8360. — d_4^{20} = 0,833; II: 0,839. — n_α = 1,49799, n_D = 1,50295, n_β = 1,51739, n_γ = 1,53009 bei 15,8°. — n_D^{20} = 1,5011; II: 1,5063.

		M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für C_9H_{12} (120,1)		39,88	40,16	0,91	1,46
Gef.	I.	42,10	42,46	1,39	2,28
	II.	42,11	42,50	1,40	2,31
EM (Mittel)		+ 2,23	+ 2,32	+ 0,49	+ 0,84
EΣ		+ 1,86	+ 1,93	+ 54 %	+ 58 %

Zur *Umlagerung* brachte man zu einem Gemisch des Semibenzols mit dem doppelten Volumen Eisessig, dessen Temperatur 20° betrug, einen Tropfen konz. Salzsäure, der an einem Thermometer hing. Unter vorübergehender Rotfärbung stieg die Temperatur bis gegen 70°, und der

Digitized by Google

entstandene aromatische Kohlenwasserstoff schied sich an der Oberfläche ab. Eine sofort angestellte Probe ergab, daß das Reaktionsprodukt bei Zimmertemperatur von Kaliumpermanganat nicht angegriffen wurde; die ganze Menge des Semibenzols war also augenblicklich umgelagert worden.

Um nachzuweisen, daß in dem Reaktionsprodukt *Pseudocumol* vorlag, destillierte man es nach dem Trocknen über Chlorcalcium und behandelte es dann ohne weitere Reinigung — es war etwas chlorhaltig — mit einer Mischung von 2 Tln. konz. Schwefelsäure und 1 Tl. rauchender Salpetersäure. In guter Ausbeute und vorzüglicher Reinheit entstand dabei das bekannte *Trinitropseudocumol* vom Schmelzp. 185°, das durch Mischprobe mit einem Vergleichspräparat identifiziert wurde.

1,1-Dimethyl-4-äthyl-cyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (II).

Zur Darstellung dieses Carbinols behandelte man je 19 g des als Ausgangsmaterial dienenden Ketons mit Magnesiumjodäthyl, reduzierte den gebildeten chlorhaltigen Alkohol mit 25 g Natrium, vereinigte die Rohprodukte von je 3 Ansätzen und rektifizierte sie nach dem Trocknen im Vakuum. Später wurden regelmäßig, ohne Nachteil für die Ausbeute, 57 g Keton auf einmal verarbeitet.

Beispielsweise wurden so aus 57 g Keton gewonnen:

8 g	einer	Fraktion	vom	Siedep.	70—80°,	
10—12 g	„	„	„	„	80—110°,	
3—4 g	„	„	„	„	110—135°,	die stark chlorhaltig war.

Sobald die Mittelfraktion begann schwach gelb gefärbt überzugehen, was von etwa 90° an der Fall war, erstarrte das Destillat meist von selbst, spätestens beim Kratzen, vollständig, während die farblos übergehenden Anteile dieser Fraktion sich beim Abkühlen nur in einen dicken Sirup verwandelten. Man kühlte die ganze Fraktion auf −20° ab, verrieb mit niedrig siedendem Petroläther und saugte die zurückbleibende Krystall-

Digitized by Google

masse ab. In ähnlicher Weise wurde auch aus dem Vorlauf festes Carbinol gewonnen. Die Gesamtausbeute betrug durchschnittlich 8—10 g, d. h. 20—25 Proz. d. Th.

Der Körper ist in allen gebräuchlichen organischen Mitteln sehr leicht löslich, läßt sich aber aus Petroläther vom Siedep. 50—60° umkrystallisieren und wird daraus in schönen, großen, durchsichtigen Tafeln oder aber in farblosen Nadeln gewonnen. Er schmilzt konstant bei 46—47°.

0,1475 g gaben 0,4250 CO_2 und 0,1360 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{16}O$	Gef.
C	78,9	78,6
H	10,6	10,3

Alle Bemühungen, aus dem Vorlauf eine einheitliche Verbindung zu isolieren, blieben erfolglos. Analysen und Titrationen mit Brom deuteten darauf hin, daß der Hauptbestandteil ein Kohlenwasserstoff von der Formel $C_{10}H_{16}$ war. Auch Versuche, den Vorlauf nach Zerstörung des noch in ihm enthaltenen Carbinols durch Schütteln mit Säure, mit siedendem Alkohol und Natrium zu reduzieren, lieferten inkonstant siedende Gemenge, aus denen sich keine gut charakterisierte Substanz herausfraktionieren ließ.

1,1-Dimethyl-4-äthencyclohexadien-(2,5) (XI).

Der Körper wurde aus dem eben beschriebenen Alkohol durch Schütteln mit der 5—10fachen Menge eiskalter 10prozentiger Schwefelsäure gewonnen. Nach $^1/_4$ Stunde war der Geruch des Carbinols völlig verschwunden. Man wusch das abgehobene Öl mit Wasser und Sodalösung, trennte es, ohne mit Äther zu verdünnen, wieder ab, goß durch ein kleines trockenes Filter, ließ 1 Stunde über Chlorcalcium stehen und rektifizierte die Substanz schließlich im Vakuum. Das erste Mal ging unter 25 mm Druck bis auf einen geringen Rückstand alles zwischen 79° und 85° über; bei der Rekti-

Digitized by Google

fikation siedete der Körper unter 16 mm Druck bei 71° bis 74°, davon die Hauptmenge bei 71°—73° (I).

Ein anderes Präparat (II) siedete unter 25 mm Druck bei 81,5—84°.

Die Ausbeute an reinem Semibenzol betrug regelmäßig 60—70 Proz. d. Th.

Da der Körper sehr flüchtig ist, wurden bei den Verbrennungen ein wenig zu niedrige Werte erhalten.

I. 0,1414 g gaben 0,4594 CO_2 und 0,1302 H_2O.
II. 0,1653 g „ 0,5378 CO_2 „ 0,1490 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{14}$	Gef. I	Gef. II
C	89,5	88,7	88,7
H	10,5	10,3	10,1

I. $d_4^{15,15} = 0,8614$. — $d_4^{20} = 0,857$. — $n_\alpha = 1,51072$, $n_D = 1,51572$, $n_\beta = 1,53015$, $n_\gamma = 1,54300$ bei 15,15°. — $n_D^{20} = 1,5135$.

II. $d_4^{12,8} = 0,8613$; daraus $d_4^{14,7} = 0,8598$. — $d_4^{20} = 0,855$. — $n_\alpha = 1,50982$, $n_D = 1,51477$, $n_\beta = 1,52946$, $n_\gamma = 1,54221$ bei 14,7°. — $n_D^{20} = 1,5124$.

		M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{10}H_{14}\overline{=}_2$ (134,11)		44,48	44,78	0,98	1,57
Gef.	I.	46,62	47,00	1,48	2,45
	II.	46,63	47,01	1,51	2,48
EM (Mittel)		+2,15	+2,23	+0,52	+0,90
EΣ		+1,60	+1,66	+53%	+57%

Um ein *Bromadditionsprodukt* des Semibenzols zu gewinnen, ließ man zu einer Auflösung des Körpers in Schwefelkohlenstoff bei −20° eine ebensolche Lösung von Brom tropfen. Trotz der tiefen Temperatur war bald eine schwache Entwicklung von Bromwasserstoff bemerkbar, und die Aufnahme von Brom kam zum Stillstand, als erst $^1/_5$—$^1/_4$ der für die Absättigung von drei Doppelbindungen berechneten Menge verbraucht war, da die entstandene Säure das Semibenzol in das aromatische Isomere umgelagert hatte.

Verhalten bei höherer Temperatur. 3 g Semibenzol wurden 1 Stunde auf 150—160° erhitzt. Das Öl wurde

Digitized by Google

hierbei ein wenig dickflüssiger und färbte sich gelblich, jedoch blieb bei der Destillation im Vakuum nur eine geringe Menge einer hochmolekularen Substanz im Kolben zurück, während das meiste bei 70° unter 17 mm Druck überging. Dieses Produkt entfärbte sofort Baeyersches Reagens und erwies sich bei der optischen Untersuchung als fast reines, unverändertes Semibenzol.

$d_4^{14,8} = 0{,}8636$. — $d_4^{20} = 0{,}859$. — $n_\alpha = 1{,}51006$, $n_D = 1{,}51504$, $n_\beta = 1{,}52917$, $n_\gamma = 1{,}54172$ bei 14,5°. — $n_D^{20} = 1{,}5126$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{10}H_{14}$ (134,11)	44,48	44,78	0,98	1,57
Gef.	46,45	46,84	1,46	2,40
EM	+1,97	+2,06	+0,48	+0,83
EΣ	+1,47	+1,54	+49%	+53%

Unter Atmosphärendruck ging das Präparat bei 175—178° über und verhielt sich nach der Destillation noch stark ungesättigt. Aus Versehen unterblieb die optische Untersuchung; nach längerem Aufbewahren war der Körper gänzlich verändert.

Da es von Interesse war festzustellen, ob sich einzelne Semibenzole tatsächlich bei gewöhnlichem Druck destillieren lassen, wurde das Äthenderivat noch einmal dargestellt. Aus unbekannten Gründen enthielt dieses Präparat, obwohl der zugehörige Alkohol gleichfalls $^1/_4$ Stunde mit Schwefelsäure geschüttelt worden war, noch ein wenig von diesem Carbinol beigemengt, denn bei der Destillation ging der Körper etwas getrübt über und wurde erst beim Stehen über Chlorcalcium klar. Der Siedepunkt konnte nicht genau bestimmt werden, da die Substanzmenge verhältnismäßig gering war, und zudem ein flotter Wasserstoffstrom durchgeleitet wurde; ungefähr lag er bei 175°.

Ein Vergleich der Konstanten *vor* (I) und *nach* (II) der Destillation zeigte, daß das Semibenzol als solches überdestilliert war; daß die EΣ-Werte des Destillats sogar etwas höher sind als die des ursprünglichen Destillats, beruht auf der Zerstörung des beigemengten Carbinols.

Digitized by Google

I. $d_4^{16,75} = 0{,}8634$. — $d_4^{20} = 0{,}861$. — $n_\alpha = 1{,}50872$, $n_D = 1{,}51357$, $n_\beta = 1{,}52755$, $n_\gamma = 1{,}53991$ bei 16,75°. — $n_D^{20} = 1{,}5121$.

II. $d_4^{16,7} = 0{,}8623$. — $d_4^{20} = 0{,}860$. — $n_\alpha = 1{,}50872$, $n_D = 1{,}51368$, $n_\beta = 1{,}52770$, $n_\gamma = 1{,}54021$ bei 16,7°. — $n_D^{20} = 1{,}5122$.

		M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{10}H_{14}$ (134,11)		44,48	44,78	0,98	1,57
Gef.	I.	46,36	46,73	1,44	2,37
	II.	46,42	46,80	1,45	2,39
EM von I		+ 1,88	+ 1,95	+ 0,46	+ 0,80
EM „ II		+ 1,94	+ 2,02	+ 0,47	+ 0,82
EΣ „ I		+ 1,40	+ 1,45	+ 47%	+ 51%
EΣ „ II		+ 1,45	+ 1,51	+ 48%	+ 52%

Oxydation. 5,7 g Substanz wurden mit einer 3- bis 4prozentigen Lösung von Kaliumpermanganat geschüttelt. Anfangs wurde trotz Kühlung durch eingeworfene Eisstückchen das Permanganat rasch entfärbt, dann verlangsamte sich aber die Reaktion und kam nach Verbrauch von $^1/_3$—$^1/_2$ der für 10 Atome Sauerstoff berechneten Menge Permanganat zum Stillstand, obwohl man das Gemisch hatte Zimmertemperatur annehmen lassen.

Durch Wasserdampf wurden aus dem Oxydationsgemisch 2—3 ccm eines aromatisch riechenden, leicht beweglichen Öles abgetrieben, das bei 185—190° siedete und keinen olefinischen Charakter besaß. Seine physikalischen Konstanten und sein bei 124° schmelzendes Trinitroderivat erwiesen es als das Umlagerungsprodukt des Athenderivats, das *as. Äthyl-o-xylol* (vgl. unten). Es ist nicht anzunehmen, daß das während der Reaktion entstandene Alkali als solches einen Teil des Ausgangsmaterials umgelagert hat, da eine derartige Wirkung von Alkali bei den hier in Betracht kommenden Körpern noch nicht beobachtet worden ist. Wahrscheinlicher ist, daß beim Angriff des Oxydationsmittels ein Teil der labilen Moleküle freiwillig in das stabilere System der aromatischen Verbindung übergeht.

Die vom Manganschlamm abfiltrierte Flüssigkeit

Digitized by Google

wurde stark eingeengt und dann angesäuert. Da sich nur eine geringe Menge Harz ausschied, schüttelte man dreimal mit Äther aus, trocknete den Auszug über Chlorcalcium und dampfte darauf ein. Es hinterblieb eine bräunliche Krystallmasse, die nach Ameisensäure oder Essigsäure roch. Durch Auskochen mit Benzol wurden die Krystalle weiß; sie schmolzen bei 184° und nach einmaligem Umkrystallisieren aus wenig heißem Wasser bei 189—190°. Die Prüfung auf Oxalsäure fiel negativ aus. Da die Säure beim Schmelzen Kohlendioxyd abspaltete, das durch Kalkwasser nachgewiesen wurde, konnte die Substanz nur *Dimethylmalonsäure* sein, deren Schmelzpunkt in der Literatur zu 186°[1]), 190°[2]) und 192—193°[3]) angegeben wird. Bestätigt wurde dies durch Vergleich mit einem Präparat der Institutssammlung, das nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser bei 187° und gemischt mit dem Oxydationsprodukte bei 187—188° schmolz. Außerdem wurden Basizität und Molekulargröße der Substanz durch die folgende Titration erwiesen.

0,0721 g verbrauchten 10,6 ccm $^n/_{10}$-NaOH; statt ber. 10,9 ccm.

	Ber. für $C_5H_8O_4$	Gef.
Molgew.	132	136

Da die bei der Oxydation gleichzeitig gebildete Fettsäure zum größten Teil beim Abdestillieren des Äthers mit diesem übergegangen sein mußte, schüttelte man diesen mit Sodalösung durch, säuerte den Auszug an und behandelte ihn zusammen mit der Mutterlauge von der Dimethylmalonsäure so lange mit Wasserdampf, bis alle flüchtige Säure übergetrieben war. Das Destillat wurde neutralisiert und zur Trockne gedampft. In der weißen Salzmasse ließ sich keine Ameisensäure nachweisen, dagegen mit Hilfe der Essigesterprobe und der Kakodylreaktion *Essigsäure*.

---

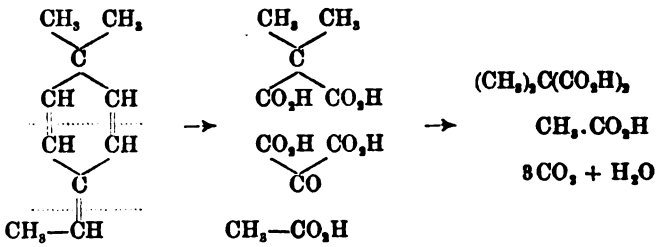
[1]) Thorne, Soc. 39, 544 (1881).

[2]) Perkin, Soc. 83, 1237 Anm. (1903).

[3]) Königs u. Hörlin, Ber. d. d. chem. Ges. 26, 2049 (1893).

Digitized by Google

Danach ist die Oxydation des Semibenzols nach folgendem Schema verlaufen:



und seine Konstitution ist damit bewiesen.

Reduktion. 9 g Semibenzol wurden in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst und in der Siedehitze mit 6 g Natrium versetzt. Das in üblicher Weise isolierte Reaktionsprodukt siedete von 155—175° und war noch ungesättigt. Die geringe Menge gestattete keine systematische Rektifikation.

Umlagerung in as. Äthyl-o-xylol. Zur Überführung in das aromatische Isomere löste man 3,5 g Kohlenwasserstoff in 7 ccm Eisessig, sättigte bei 0° mit Salzsäuregas, ließ einige Stunden stehen, goß das Gemisch in Wasser, nahm das Öl in Wasser auf, wusch mit Wasser und Sodalösung, trocknete über Chlorcalcium, verjagte vorsichtig den Äther und destillierte den Rückstand im Vakuum. Bei weitem die Hauptmenge ging unter 13 mm Druck bei 76—80° über, ein geringer, chlorhaltiger Nachlauf folgte bis 130°. Eine nennenswerte Anlagerung von Chlorwasserstoff an das Semibenzol hatte also auch unter diesen Bedingungen nicht stattgefunden, da offenbar die Umlagerung wieder sofort eingetreten war.

Zur völligen Reinigung wurde der Hauptlauf noch einmal, über Natrium, unter gewöhnlichem Druck destilliert, wobei die Substanz konstant bei 186—187° siedete.

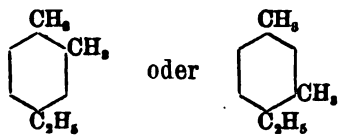
Von den beiden, fast übereinstimmenden Beobachtungsreihen, die mit dem Körper angestellt wurden, teilen wir hier nur die zur Kontrolle dienende zweite mit.

Digitized by Google

$d_4^{15,2} = 0{,}8777$; daraus $d^{15,05} = 0{,}8776$. — $d_4^{20} = 0{,}874$. — $n_\alpha = 1{,}50108$, $n_D = 1{,}50489$, $n_\beta = 1{,}51606$, $n_\gamma = 1{,}52531$ bei 15,05°. — $n_D^{20} = 1{,}5027$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{10}H_{14}$ (134,11)	44,48	44,78	0,98	1,57
Gef.	45,02	45,32	1,14	1,83
EM	+ 0,54	+ 0,54	+ 0,16	+ 0,26
EΣ	+ 0,40	+ 0,40	+ 16%	+ 16%

Da der Körper vermutlich eine der beiden Formeln



besaß, stellten wir zuerst ein Vergleichspräparat der ersteren Verbindung, des *as. Äthyl-o-xylols*, dar.

Zu diesem Zweck wurde zunächst nach der Vorschrift von Claus[1]) aus o-Xylol, Acetylchlorid und Aluminiumchlorid das *as. Aceto-o-xylol* bereitet. Das Präparat siedete bei 244—246° (Claus: 246—247°) und besaß im übrigen folgende Konstanten:

$d_4^{15,0} = 1{,}0669$; daraus $d_4^{15,5} = 1{,}0073$. — $d_4^{20} = 1{,}003$. — $n_\alpha = 1{,}53558$, $n_D = 1{,}54083$, $n_\beta = 1{,}55578$, $n_\gamma = 1{,}56916$ bei 15,5°. — $n_D^{20} = 1{,}5388$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{10}H_{12}O''$ (148,10)	44,48	44,79	0,99	1,59
Gef.	45,82	46,19	1,43	2,36
EM	+1,34	+1,40	+0,44	+0,77
EΣ	+0,90	+0,95	+44%	+48%

Frühere Bestimmungen[2]) hatten ganz ähnliche Werte ergeben.

Zur Reduktion kochte man 15 g des Ketons mit 60 g amalgamiertem Zink und der nötigen Menge Salzsäure (1:1). Bei der zweiten Rektifikation über Natrium ging der Kohlenwasserstoff konstant bei 186—187° über.

[1]) Journ. f. prakt. Chem. [2] 41, 409 (1890).

[2]) Auwers, Ber. d. d. chem. Ges. 45, 2769, 2780 (1912).

Digitized by Google

$d_4^{15,0} = 0{,}8782$. — $d_4^{20^\circ} = 0{,}874$. — $n_\alpha = 1{,}50142$, $n_D = 1{,}50526$, $n_\beta = 1{,}51647$, $n_\gamma = 1{,}52584$ bei 15,0°. — $n_D^{20^\circ} = 1{,}5030$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{10}H_{14}F_2$ (134,11)	44,48	44,78	0,98	1,57
Gef.	45,03	45,32	1,14	1,85
EM	+ 0,55	+ 0,54	+ 0,16	+ 0,28
EΣ	+ 0,41	+ 0,40	+ 16%	+ 16%

Die Werte decken sich fast vollkommen mit den Beobachtungen an dem durch Umlagerung erhaltenen Präparat, so daß an der Identität beider Produkte kaum mehr ein Zweifel möglich war. Trotzdem erwärmte man Proben beider Produkte 1 Stunde auf dem Wasserbad mit einem Gemisch von 1 Tl. rauchender Salpetersäure und 2 Tln. konz. Schwefelsäure. Nach dem Eingießen in Wasser erstarrten die anfangs öligen Substanzen rasch und schmolzen nach zweimaligem Umkrystallisieren für sich und gemischt bei 124°. Stahl[1]) fand den Schmelzpunkt für das *Trinitroderivat* dieses Äthylxylols bei 121°.

1,1-Dimethyl-4-propencyclohexadien-(2,5) (XIV).

31 g Ausgangsketon behandelte man mit 47 g Propylbromid und 9,7 g Magnesium und reduzierte das Reaktionsprodukt in 2100 ccm feuchtem Äther mit 50 g Natriumdraht. Bei der Vakuumdestillation des nach dem Entfernen des Äthers verbliebenen Rückstandes wurden unter 10 mm Druck folgende Fraktionen aufgefangen:

I. 60—90°. II. 90—120°, davon die Hauptmenge bei 95—105°. III. 120—140°.

Die Mittelfraktion, in der das chlorfreie Carbinol zu vermuten war, erstarrte auch bei kräftiger Abkühlung nicht, sondern nahm nur Sirupskonsistenz an. Da sie auch beim Verreiben nichts Krystallinisches lieferte und zudem noch etwas Chlor enthielt, wurde das Produkt ohne weitere Reinigung auf das Semibenzol verarbeitet.

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. **23**, 992 (1890).

Digitized by Google

Nach der üblichen Behandlung mit eiskalter Schwefelsäure erhielt man ein Öl, das nach dem Trocknen unter 13 mm Druck fast vollständig bei 83—87°, davon das meiste bei 83—85° überging. Die Hauptfraktion wurde ohne weitere Reinigung optisch untersucht.

$d_4^{15,2} = 0{,}8618$. — $d_4^{20} = 0{,}858$. — $n_\alpha = 1{,}50189$, $n_D = 1{,}50633$, $n_\beta = 1{,}51925$, $n_\gamma = 1{,}53040$ bei 15,2°. — $n_D^{20} = 1{,}5042$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{16}$ (148,13)	49,08	49,40	1,05	1,68
Gef.	50,72	51,10	1,47	2,41
EM	+1,64	+1,70	+0,42	+0,73
EΣ	+1,11	+1,15	+40%	+44%

Die Zahlen zeigen, daß das Präparat zwar ein Semibenzol enthielt, daneben aber noch einen anderen Körper. Über die Natur dieser Beimengung gab die Analyse Aufschluß.

0,1068 g gaben 0,3486 g CO_2 und 0,1048 g H_2O.

	Ber. für $C_{11}H_{16}$	Gef.
C	89,1	89,1
H	10,9	11,0

Da die Verbrennung genau auf die Formel des erwarteten Semibenzols stimmt, kommt als Verunreinigung lediglich eine isomere Verbindung in Frage, d. h. das *Propenderivat* hatte sich bereits zum Teil in den aromatischen Kohlenwasserstoff verwandelt.

Umlagerung in as. Propyl-o-xylol. Zur Umlagerung verwendete man in diesem Fall nicht das isolierte Semibenzol, sondern ging vom zugehörigen tertiären Alkohol aus. 8 g rohes Carbinol wurden im doppelten Volumen Eisessig gelöst und mit einigen Tropfen konz. Salzsäure versetzt. Die Temperatur des Gemisches stieg sehr langsam von 15° auf 20°; erst als etwa 1 ccm Salzsäure zugegeben war, war ein rascherer Temperaturanstieg bis 40° zu beobachten. Man schüttelte den abgeschiedenen Kohlenwasserstoff noch einige Zeit mit der Säure und isolierte ihn dann in der gebräuchlichen Weise. Da das

Digitized by Google

Rohprodukt chlorhaltig war, ließ man es einige Zeit über Natrium sieden und rektifizierte es dann. Bei der zweiten Destillation ging die Substanz konstant bei 201° bis 203° über. Nachdem das Präparat optisch untersucht worden war (I), destillierte man es nochmals und führte Kontrollbestimmungen aus (II). Da die beiden Beobachtungsreihen etwas voneinander abweichen, geben wir sie beide wieder.

I. $d_4^{15,8} = 0{,}8677$. — $d_4^{20} = 0{,}864$. — $n_\alpha = 1{,}49390$, $n_D = 1{,}49752$, $n_\beta = 1{,}50804$, $n_\gamma = 1{,}51681$ bei 15,3°. — $n_D^{20} = 1{,}4954$.

II. $d_4^{12,85} = 0{,}8718$; daraus $d_4^{12,7} = 0{,}8719$. — $d_4^{20} = 0{,}866$. — $n_\alpha = 1{,}49504$, $n_D = 1{,}49881$, $n_\beta = 1{,}50920$, $n_\gamma = 1{,}51784$ bei 12,7°. — $n_D^{20} = 1{,}4955$.

		M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{16}$ (148,13)		49,08	49,40	1,05	1,68
Gef.	I.	49,69	50,00	1,20	1,94
	II.	49,55	49,87	1,19	1,92
EM (Mittel)		+ 0,54	+ 0,54	+ 0,15	+ 0,25
EΣ	„	+ 0,36	+ 0,36	+ 14%	+ 15%

Da in dem Umlagerungsprodukt nach Analogien das *as. Propyl-o-xylol* vorlag, stellte man auf entsprechende Weise wie beim niedrigeren Homologe ein Vergleichspräparat dieser Verbindung dar.

Das bisher noch nicht bekannte *as. Propionyl-o-xylol* — aus o-Xylol (1 Molg.), Propionylchlorid (1,1 Molg.) und Aluminiumchlorid (1,2 Molg.) — ist ein dickes, gelbliches Öl, das bei 258—262° siedet. Aus 6 g Xylol wurden 8 g Keton, d. h. 90 Proz. d. Th., gewonnen.

0,1730 g gaben 0,5170 CO_2 und 0,1348 H_2O.

	Ber. für $C_{11}H_{14}O$	Gef.
C	81,4	81,5
H	8,7	8,7

Sein *Semicarbazon* krystallisiert aus Alkohol in farblosen, glänzenden Nadeln, die unter vorhergehendem Erweichen bei 192—193° schmelzen. Im allgemeinen schwer löslich.

Digitized by Google

0,1228 g gaben 20,4 ccm feuchtes Stickgas bei 13° u. 743 mm Druck.

	Ber. für $C_{12}H_{17}ON_3$	Gef.
N	19,2	19,2

Bei der Reduktion nach der Clemmensenschen Methode wurden aus 6 g Keton 3—4 g Kohlenwasserstoff gewonnen. Das *as. Propyl-o-xylol* wurde zweimal über Natrium destilliert und siedete bei 202—204°. Uhlhorn[1]) fand den Siedepunkt bei 209°.

Von den beiden gut übereinstimmenden Beobachtungsreihen sei hier nur die letzte mitgeteilt.

$d_4^{15,0} = 0{,}8750$; daraus $d_4^{15,1} = 0{,}8749$. — $d_4^{20} = 0{,}871$. — $n_\alpha = 1{,}49925$, $n_D = 1{,}50294$, $n_\beta = 1{,}51375$, $n_\gamma = 1{,}52277$ bei 15,1°. — $n_D^{20} = 1{,}5007$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{16}$ (148,13)	49,08	49,40	1,05	1,68
Gef.	49,73	50,05	1,22	1,97
EM	+ 0,65	+ 0,65	+ 0,17	+ 0,29
EΣ	+ 0,44	+ 0,44	+ 16%	+ 17%

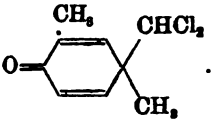
Da die beiden Präparate des Propyl-o-xylols in ihren physikalischen Konstanten nicht so vollkommen übereinstimmten, wie es bei denen des Äthylxylols der Fall gewesen war, mußte auch auf chemischem Wege ihre Identität festgestellt werden. Zu diesem Zweck führte man Proben beider Präparate in das bereits von Uhlhorn dargestellte *Tribromderivat* über, das nach seinen Angaben bei 48° schmilzt. Man versetzte den Kohlenwasserstoff mit etwas Eisenpulver und fügte unter Kühlung sehr allmählich einen Überschuß von Brom hinzu. Nachdem die lebhafte Reaktion beendet war, ließ man noch einige Zeit stehen, goß dann in Wasser, nahm das Reaktionsprodukt in Äther auf, wusch mit Natronlauge und trocknete über Chlorcalcium. Nach dem Verdunsten des Äthers hinterblieb ein Öl, das beim Abkühlen und Kratzen erstarrte. Aus Methylalkohol konnte die Substanz, die von den meisten organischen Mitteln

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 23, 2349 (1890).

Digitized by Google

sehr leicht aufgenommen wird, umkrystallisiert werden. Beide Präparate verhielten sich bei der Bromierung gleich. Das Bromid aus dem durch Umlagerung gewonnenen Kohlenwasserstoff schmolz bei 42°, das aus dem synthetischen Präparat bei 44—45°, ein Gemisch beider bei 43—44°.

Abkömmlinge des Ketons



Aus den im allgemeinen Teil dieser Arbeit dargelegten Gründen wurden die spektrochemischen Konstanten dieses Ketons bestimmt. Obwohl der Körper erst bei 56—57° schmilzt, konnte er doch bequem in unterkühltem Zustand bei Zimmertemperatur untersucht werden.

$Sp._{18} = 147{,}5—149°$. — $d_4^{20{,}5} = 1{,}2405$. — $d_4^{20} = 1{,}241$. — $n_\alpha = 1{,}53960$, $n_D = 1{,}54379$, $n_\beta = 1{,}55613$, $n_\gamma = 1{,}56675$ bei 20,5°. — $n_D^{20} = 1{,}5440$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_9H_{10}O''Cl_2\Gamma_2$ (205,00)	50,07	50,37	1,00	1,61
Gef.	51,82	52,15	1,31	2,15
EM	+1,75	+1,78	+0,31	+0,54
EΣ	+0,85	+0,87	+31%	+34%

1,1,3,4-Tetramethylcyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (IV).

Man bereitete aus 50 g Keton, 75 g Jodmethyl und 12 g Magnesium den gechlorten tertiären Alkohol und reduzierte ihn in bekannter Weise. Bei der Destillation unter 16 mm Druck wurden folgende Fraktionen aufgefangen:

I. 60—75°. II. 75—95°. III. 95—115°.

Die zweite Fraktion, die das meiste Carbinol enthielt, färbte sich erst zu allerletzt etwas gelblich. Sie erstarrte in einer Kältemischung zu einem dicken, Fraktion I zu einem dünnen Sirup. Beim Verreiben mit

Digitized by Google

niedrigsiedendem Petroläther wurden aus beiden Destillaten insgesamt 9,2 g reines, krystallinisches Carbinol gewonnen, d. h. 28 Proz. d. Th.

Der Körper ist in den meisten der gewöhnlichen Lösungsmittel leicht löslich, in kaltem Petroläther mäßig und scheidet sich aus diesem Mittel in wasserhellen Nadeln ab, die bei 50,5—51,5° schmelzen.

I. 0,1035 g gaben 0,3011 CO_2 und 0,0990 H_2O.
II. 0,0996 g „ 0,2889 CO_2 „ 0,0969 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{16}O$	Gef. I	Gef. II
C	78,9	79,4	79,1
H	10,6	10,7	10,9

Wie bereits erwähnt, ließ sich aus diesem Alkohol nicht das zugehörige Semibenzol gewinnen, da sich dieses sofort in den aromatischen Kohlenwasserstoff verwandelte.

Überführung des Carbinols in Durol.

8 g des tertiären Alkohols wurden mit eiskalter 10prozentiger Schwefelsäure geschüttelt. Dabei verflüssigte sich die Masse nicht, wie in anderen Fällen, sondern blieb stets teigig. Man glaubte daher anfangs, daß das Carbinol von der Säure schwer angegriffen werde und schüttelte das Gemisch unter gelindem Erwärmen auf 30—40° 1 Stunde lang, ohne jedoch eine wesentliche Änderung zu erzielen. Als darauf eine Probe auf Ton abgepreßt und ihr Schmelzpunkt bestimmt wurde, ergab sich, daß aus dem Alkohol *Durol* entstanden war, denn die Substanz schmolz bei 79—80° und gab mit Durol keine Schmelzpunktserniedrigung.

Nun wurde zur Vervollständigung der Umsetzung noch 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Beim Erkalten erstarrte das Reaktionsprodukt krystallinisch und wurde unter gewöhnlichem Druck destilliert. Das meiste ging bei 190—195° über und wurde vollkommen fest; eine kleine, höher siedende Menge erstarrte weniger gut. Um

Digitized by Google

das Durol von geringen öligen Beimengungen zu trennen, verrieb man das gesamte Destillat mit Eisessig und saugte das zurückbleibende Durol ab. Beim Eingießen des Filtrates in Wasser schied sich neben etwas Öl noch Durol ab, das wiederum abfiltriert wurde. Darauf schüttelte man das Öl mit Kaliumpermanganatlösung, um eine geringe Menge ungesättigter Substanz zu zerstören. Als darauf das Produkt destilliert wurde, gingen zwischen 190° und 195° etwa 0,4—0,5 ccm eines farblosen Öles über, das beim Erkalten zum größten Teil erstarrte, also gleichfalls der Hauptsache nach aus Durol bestand. Die Gesamtausbeute an Durol war sehr gut; irgendein isomerer Kohlenwasserstoff war jedenfalls nicht in nennenswertem Betrage entstanden.

Um die Intensität der Umlagerung zu prüfen, versetzte man ein Gemisch von 1 g Carbinol und 2 g Eisessig mit einem Tropfen konzentrierter Salzsäure. Die Temperatur stieg rasch von 20° auf 70° und beim Eingießen in Wasser schied sich das Durol fest aus.

1,1,3-Trimethyl-4-äthylcyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (V).

Das Reaktionsprodukt aus 50 g Keton, 80 g Jodäthyl und 12 g Magnesium wurde mit 75 g Natriumdraht in 2,5—3 Liter feuchtem Äther reduziert. Folgende Fraktionen wurden erhalten:

I. 70—80°. II. 80—92°. III. Geringer Nachlauf.

Die zweite Fraktion ging von Anfang an gelb über. Obwohl durch einen Unglücksfall etwa die Hälfte des Materials verloren ging, konnten doch aus der Mittelfraktion durch Abkühlen und Verreiben mit Petroläther 6,5 g schneeweißes, krystallisiertes Carbinol gewonnen werden, so daß die Gesamtausbeute auf 35—40 Proz. d. Th. geschätzt werden darf.

Der Körper ähnelt seinem niedrigeren Homologen in jeder Beziehung und schmilzt bei 47—48°.

Digitized by Google

0,0949 g gaben 0,2748 CO_2.[1])

	Ber. für $C_{11}H_{18}O$	Gef.
C	79,5	79,0

1,1,3-Trimethyl-4-äthencyclohexadien-(2,5) (XII).

Das eben beschriebene Carbinol ist gegen kalte 10prozentige Schwefelsäure verhältnismäßig beständig, denn es zerfloß erst nach 10minutigem Schütteln allmählich. Nach weiteren 10 Minuten wurde das Reaktionsprodukt abgetrennt und wie üblich aufgearbeitet.

Unter 18 mm Druck erhielt man folgende Fraktionen:

I. 88—89° (wenige Tropfen). II. 91—96° (2—3 ccm).
III. 96—99° (1 ccm).

Im Kolben blieb ein geringer harziger Rückstand.

Die optische Untersuchung machte es wahrscheinlich, daß dem Semibenzol noch Carbinol beigemengt war. Sämtliche Fraktionen wurden daher zusammen nochmals $^1/_2$ Stunde mit Schwefelsäure geschüttelt. Nunmehr wurde eine Verbindung gewonnen, die unter 15 mm Druck konstant bei 85—86° siedete und folgende Konstanten besaß:

$d_4^{12,7} = 0{,}8844$. — $d_4^{20} = 0{,}879$. — $n_\alpha = 1{,}51470$, $n_D = 1{,}51931$, $n_\beta = 1{,}53280$, $n_\gamma = 1{,}54371$ bei 12,7°. — $n_D^{20} = 1{,}5160$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{16}$ (148,13)	49,08	49,40	1,05	1,68
Gef.	50,48	50,86	1,45	2,37
EM	+ 1,40	+ 1,46	+ 0,40	+ 0,69
EΣ	+ 0,95	+ 0,99	+ 38 %	+ 41 %

0,1119 g gaben 0,3668 CO_2 und 0,1106 H_2O.

	Ber. für $C_{11}H_{16}$	Gef.
C	89,1	89,4
H	10,9	11,1

Umlagerung in sym. Äthylpseudocumol. Auf Zusatz von 1 ccm 70prozentiger Schwefelsäure zu einer Lösung

[1]) Die Wasserbestimmung ging verloren. — Wir haben uns mit dieser Analyse begnügt, weil zwei weitere Verbrennungen wegen der in jener Zeit häufigen Störungen in der Zufuhr des elektrischen Stroms verunglückten, und die für analytische Zwecke zurückbehaltene Substanzmenge aufgebraucht war.

Digitized by Google

von etwa 1 g Semibenzolderivat in 2 ccm Eisessig erwärmte sich das Gemisch von 20° auf 40°, und der aromatische Kohlenwasserstoff schied sich aus. Um die Umwandlung zu vervollständigen, brachte man das Öl durch mehr Eisessig wieder in Lösung und erwärmte auf dem Wasserbade, bis nach $^1/_2$ Stunde eine herausgenommene Probe gegen Permanganat beständig war.

Der gereinigte Körper siedete konstant bei 210° bis 211° und stimmte auch in seinen übrigen Eigenschaften genügend mit dem erwarteten *sym. Äthylpseudocumol* überein, dessen Konstanten[1]) zum Vergleich unter II beigefügt sind.

$d_4^{12,15} = 0{,}8937$; daraus $d_4^{12,05} = 0{,}8938$. — $d_4^{20} = 0{,}887$ (II: 0,883). — $n_\alpha = 1{,}51078$, $n_D = 1{,}51474$, $n_\beta = 1{,}52580$, $n_\gamma = 1{,}53481$ bei 12,05°. — $n_D^{20} = 1{,}5111$ (II: 1,5086).

		M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{16}$ (148,13)		49,08	49,40	1,05	1,68
Gef.	I	49,63	49,96	1,23	1,95
	II	49,68	50,00	1,24	2,01
E M (Mittel)		+ 0,58	+ 0,58	+ 0,19	+ 0,30
E Σ	„	+ 0,39	+ 0,39	+ 18 %	+ 18 %

Um die Identität des Umlagerungsproduktes mit dem *sym.* Äthylpseudocumol auch auf chemischem Wege zu beweisen, verwandelte man Proben beider Produkte in das *Dibromderivat.* Man gab zu dem Kohlenwasserstoff eine Spur Jod und erwärmte ihn dann mit überschüssigem Brom auf dem Wasserbad, bis die Schmelze farblos geworden war. Beide Präparate verhielten sich hierbei völlig gleich; namentlich besaßen die beim Erstarren des Reaktionsproduktes entstehenden Krystalle in beiden Fällen dieselben charakteristischen, an Magnesiumammoniumphosphat erinnernden Formen. Das aus synthetischem Äthylpseudocumol gewonnene Bromid schmolz bei 55°; das andere, das wegen der geringen Menge nicht weiter gereinigt werden konnte, bei 51—52°. Der Schmelzpunkt eines Gemisches lag bei 52—53°.

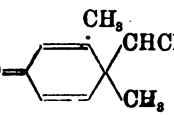
[1]) Auwers, diese Annalen 419, 119 (1919).

Digitized by Google

Töhl und Karchowski[1]) geben den Schmelzpunkt der Substanz zu 218° an. Hier muß irgendein Versehen vorliegen, denn daß unser Präparat tatsächlich ein *Dibromderivat* war, wurde durch eine Brombestimmung bewiesen.

0,2075 g verbrauchten nach Baubigny und Chavanne 13,6 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{11}H_{14}Br_2$	Gef.
Br	52,2	52,4

Abkömmlinge des Ketons 

1,1,2,4-Tetramethylcyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (VI).

Das gechlorte Carbinol wurde aus 30 g Keton, 45 g Jodmethyl und 7,2 g Magnesium dargestellt und in 1,5—2 Liter feuchtem Äther mit 45 g Natriumdraht reduziert. Bei der Destillation unter 17 mm Druck fing man folgende Fraktionen auf:

I. 60—80°. II. 80—110°, davon das meiste bei 90—95°. III. 110—130°.

Dieses Carbinol ging durchweg farblos über. Da die Hauptfraktion II auch in einer Kältemischung nicht erstarrte, wurde sie nochmals rektifiziert und destillierte unter 15 mm Druck der Hauptsache nach bei 83—87° als wasserhelles, dickliches Öl. Bei längerer Abkühlung auf −20° erstarrte das Öl beim Kratzen zu einem dicken Sirup, aus dem sich durch Verreiben mit Petroläther und rasches Absaugen eine kleine Menge Carbinol in festem Zustand erhalten ließ, doch wurde auch diese Probe bei Zimmertemperatur wieder breiartig und schmolz bei 20° völlig. Der Schmelzpunkt der Verbindung scheint demnach zwischen 10° und 20° zu liegen. Kohlenwasserstoff war nicht beigemengt, denn eine Verbrennung lieferte stimmende Werte.

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 25, 1531 (1892).

Digitized by Google

0,1239 g gaben 0,3575 CO_2 und 0,1215 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{16}O$	Gef.
C	78,9	78,7
H	10,6	11,0

Da das Präparat somit rein war oder höchstens ein Gemisch stereoisomerer Formen des Alkohols darstellte, wurde es optisch untersucht.

$d_4^{10,0} = 0{,}9333$; daraus $d_4^{10,1} = 0{,}9332$. — $d_4^{20} = 0{,}925$. — $n_\alpha = 1{,}48376$, $n_D = 1{,}48685$, $n_\beta = 1{,}49502$, $n_\gamma = 1{,}50176$ bei 10,1°. — $n_D^{20} = 1{,}4824$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{10}H_{16}O$ (152,13)	46,50	46,77	0,90	1,44
Gef.	46,62	46,87	0,92	1,47
EM	+0,12	+0,10	+0,02	+0,03
EΣ	+0,08	+0,07	+ 2%	+ 2%

1,1,2-Trimethyl-4-methencyclohexadien-(2,5) (XV).

Für die Darstellung dieses Semibenzols wurden 3 g des eben beschriebenen öligen Carbinols verwendet. Man schüttelte es $^1/_4$ Stunde mit eiskalter 10 prozentiger Schwefelsäure, wusch in ätherischer Lösung mit Soda und Wasser, trocknete über Chlorcalcium und saugte den Äther vorsichtig ab. Als der Rückstand im Vakuum destilliert werden sollte, ging unter 15 mm Druck bei 60—65° nur eine geringe Menge, etwa $^1/_2$—$^3/_4$ ccm, als wasserhelle Flüssigkeit über, alles andere hatte sich polymerisiert und blieb zurück.

Die Untersuchung des Destillates lieferte folgende Werte:

$d_4^{10,7} = 0{,}8735$. — $d_4^{20} = 0{,}866$. — $n_\alpha = 1{,}51331$, $n_D = 1{,}51813$, $n_\beta = 1{,}53213$, $n_\gamma = 1{,}54435$ bei 10,7°. — $n_D^{20} = 1{,}5139$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{10}H_{14}$ (134,11)	44,48	44,78	0,98	1,57
Gef.	46,17	46,53	1,42	2,32
EM	+ 1,69	+ 1,75	+ 0,44	+ 0,75
EΣ	+ 1,26	+ 1,31	+ 45%	+ 48%

Die Zahlen zeigen, daß der Körper ein Semibenzol war, doch erscheinen die spezifischen Exaltationen,

Digitized by Google

namentlich des Brechungsvermögens, zu niedrig. Ob dies daher rührt, daß die Verbindung nicht aus einem unzweifelhaft einheitlichen, festen Carbinol hergestellt werden konnte, oder durch eine partielle Umlagerung in das aromatische Isomere verursacht war, ließ sich nicht feststellen, da die geringe Substanzmenge keine weitere Rektifikation gestattete.

Umlagerung. Es wurde daher auch von einer Analyse abgesehen; vielmehr sollte die ganze Menge zu einem Umlagerungsversuch verwendet werden. Als dieser aber am nächsten Morgen vorgenommen werden sollte, hatte sich die Substanz bereits so weit polymerisiert, daß die Behandlung mit Eisessig und Schwefelsäure nichts Brauchbares lieferte.

Es wurde daher eine neue Menge — 3 g — des Carbinols dargestellt und diese, die wiederum ölig blieb, in bekannter Weise unmittelbar auf aromatischen Kohlenwasserstoff verarbeitet. Aber auch in diesem Fall entstanden zum größten Teil hochsiedende Polymerisationsprodukte, und nur wenig eines farblosen Öls ging zwischen 180° und 200° über. Bei der zweiten Destillation — über Natrium — siedete das Produkt bei 192—196° und war beständig gegen Permanganat, doch zeigte die optische Untersuchung, daß dem Kohlenwasserstoff eine Verunreinigung anhaften mußte, da sowohl die Molrefraktion wie die Moldispersion etwas zu niedrig gefunden wurden.

Da man in dem Körper *Isodurol* vermutete, versuchte man das charakteristische *Dinitroderivat* aus ihm darzustellen. Beim Verreiben einer kleinen Probe mit einem Gemisch von 10 Tropfen rauchender Salpetersäure und 20 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure erhielt man sofort ein festes Produkt. Durch schwaches Erwärmen auf dem Wasserbad wurde die Nitrierung vollendet, worauf man das durch Wasser abgeschiedene Produkt aus Alkohol umkrystallisierte. Es schied sich, entsprechend der Beschreibung, die Jacobsen[1]) von dem Körper gibt, in

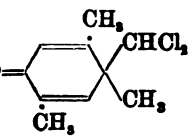
[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 15, 1853 (1882).

Digitized by Google

langen, dünnen, farblosen Nadeln ab, die völlig einheitlich aussahen, aber nicht, wie angegeben, bei 156°, sondern unscharf zwischen 100° und 110° schmolzen. Da für weiteres Umkrystallisieren die Menge nicht ausreichte, und auch kein Vergleichspräparat beschafft werden konnte, bleibt es etwas fraglich, ob das Präparat wirklich unreines Dinitroisodurol darstellte.

Das *Bromierungsprodukt* schmolz bei 195°. Da die Schmelzpunkte der Dibromderivate der drei Kohlenwasserstoffe: Prehnitol, Durol und Isodurol nahe beieinander liegen, und nach den Untersuchungen von R. Meyer und W. Meyer[1]) Gemische derartiger Verbindungen häufig keine Schmelzpunktsdepression aufweisen, konnte aus dem Schmelzpunkt des Präparates kein positiver Schluß gezogen werden. Jedoch machte es die Löslichkeit des Körpers in Alkohol wahrscheinlich, daß in ihm *Dibromisodurol* vorlag.

Abkömmlinge des Ketons



1,1,3,4,6-Pentamethylcyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (VII).

Der gechlorte tertiäre Alkohol aus 50 g Keton, 75 g Jodmethyl und 12 g Magnesium wurde in 2,5 Liter feuchtem Äther mit 75 g Natriumdraht reduziert. Die Vakuumdestillation ergab unter 12 mm Druck folgende Fraktionen:

I. 75—85°. II. 85—110°. III. 110—113°.

Die zweite Fraktion ging von Anfang an gelb über. Da sie auch bei starker Kühlung trotz Kratzens nicht erstarrte, wurde sie nochmals rektifiziert, wobei sie unter dem gleichen Druck bei 85—95° als schwach gelbes Öl destillierte. Auch dieses Präparat konnte nicht zum Er-

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 52, 1249 (1919).

Digitized by Google

starren gebracht werden; die Beilsteinsche Probe zeigte eine Spur Chlor an. Die Ausbeute betrug 9,5 g.

Eine Analyse lieferte annähernd stimmende Werte, doch zeigte die optische Untersuchung, daß das Produkt eine Verunreinigung enthielt.

0,1638 g gaben 0,4789 CO_2 und 0,1548 H_2O.

	Ber. für $C_{11}H_{18}O$	Gef.
C	79,4	79,8
H	10,9	10,6

1,1,3,6-Tetramethyl-4-methencyclohexadien-(2,5) (XIII).

Die gesamte Menge des gewonnenen Carbinols schüttelte man 10 Minuten mit eiskalter verdünnter Schwefelsäure und arbeitete dann das Reaktionsprodukt in der gewöhnlichen Weise auf. Bei der Rektifikation unter 12 mm Druck wurden folgende Fraktionen aufgefangen:

I. 75—76°. II. 76—79°, davon die Hauptmenge bei 78—79°. III. 79—95°, unbedeutend.

Fraktion II war völlig chlorfrei und stark ungesättigt. Man ermittelte ihre Konstanten, destillierte sie nochmals — $Sp._{12} = 77°$ — und führte Kontrollbestimmungen aus. Beide Beobachtungsreihen lieferten innerhalb der Fehlergrenzen identische Werte.

$d_4^{15,2} = 0{,}8809$. — $d_4^{20} = 0{,}877$. — $n_\alpha = 1{,}51235$, $n_D = 1{,}51687$, $n_\beta = 1{,}53006$, $n_\gamma = 1{,}54172$ bei 15,2°. — $n_D^{20} = 1{,}5147$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{16}$ (148,13)	49,08	49,40	1,05	1,68
Gef.	59,49	50,86	1,46	2,41
EM	+ 1,41	+ 1,46	+ 0,41	+ 0,73
EΣ	+ 0,95	+ 0,99	+ 39%	+ 43%

0,0889 g gaben 0,2887 CO_2 und 0,0886 H_2O.

	Ber. für $C_{11}H_{16}$	Gef.
C	89,1	88,6
H	10,9	11,2

Umlagerung in Pentamethylbenzol. Bei der Umlagerung des Semibenzols, die in Eisessig durch Salzsäure bewirkt wurde, stieg die Temperatur von 15° auf 30°. Zur

Digitized by Google

Vervollständigung der Reaktion erwärmte man noch einige Zeit unter öfterem Umschütteln auf dem Wasserbad, trennte darauf das Reaktionsprodukt ab, kochte es über Natrium und rektifizierte es schließlich.

Man fing eine Fraktion von 205—215° und eine von 215—225° auf. Die zweite erstarrte zum allergrößten Teil; die auf Ton abgepreßte Substanz schmolz ohne weitere Reinigung bei 49—51° und gemischt mit vorrätigem Pentamethylbenzol, dessen Schmelzpunkt bei 50—52° lag, bei 50—51°. Der Körper war somit *Pentamethylbenzol.*

Die erste Fraktion entfärbte sofort Permanganat, enthielt also noch hydroaromatische Beimengungen. Durch nochmalige Rektifikation konnte sie in einen bei 205° bis 210° und einen bei 210—215° siedenden Anteil zerlegt werden. Von diesen erstarrte der erste auch in einer Kältemischung nur unvollständig, der zweite dagegen bereits in Eiswasser weitgehend, bestand also in der Hauptsache aus Pentamethylbenzol. Dieser Kohlenwasserstoff bildete also bei weitem das Hauptprodukt der Umlagerung.

Zur Ergänzung älterer Beobachtungen von Eykman[1], die bei 107,2° angestellt worden waren, wurde das Pentamethyl *spektrochemisch* untersucht.

$d_4^{3,5} = 0{,}8780$; daraus $d_4^{1,8} = 0{,}8786$. — $d_4^{2,0} = 0{,}921$. — $n_\alpha = 1{,}50104$, $n_D = 1{,}50489$, $n_\beta = 1{,}51609$. — $n_D^{2,0} = 1{,}5287$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{16}$	49,08	49,40	1,05
Gef.	49,68	50,00	1,25
EM	+ 0,60	+ 0,60	+ 0,20
EΣ	+ 0,41	+ 0,41	+ 19%

1,1,3,5-Tetramethyl-4-äthylcyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (VIII).

Zur Darstellung dieses Alkohols ließ man 50 g Jodäthyl und 7,2 g Magnesium auf 30 g Keton wirken und reduzierte das Reaktionsprodukt in 1,5 Liter feuchtem Äther mit 50 g Natriumdraht.

[1]) Rec. 12, 175 (1893).

Digitized by Google

Durch mehrfache Rektifikation im Vakuum erhielt man ein Produkt, das unter 13 mm Druck in der Hauptsache bei 93—100° als dickes, orangegelbes Öl überging, doch war deutlich Abspaltung von Wasser zu beobachten. Dementsprechend erwies sich die Substanz bei der Analyse als ein Gemisch des oben genannten *Carbinols* und des aus ihm entstehenden *Semibenzols.*

0,1020 g gaben 0,3196 CO_2 und 0,0987 H_2O.

	Ber. für $C_{12}H_{20}O$	Ber. für $C_{12}H_{18}$	Gef.
C	79,9	88,8	85,5
H	11,2	11,2	10,9

1,1,3,6-Tetramethyl-4-äthencyclohexadien-(2,5) (XVI).

Obwohl das Carbinol bei der Destillation zur Wasserabspaltung neigte, wurde es doch durch Schwefelsäure verhältnismäßig langsam in das zugehörige Semibenzol verwandelt, denn erst nach 20 minutigem Schütteln mit verdünnter Schwefelsäure war der Geruch des Alkohols verschwunden.

Das *Tetramethyläthencyclohexadien* ging als wasserhelle, leicht bewegliche Flüssigkeit bei 99—101° unter 17 mm Druck über. Nach der spektrochemischen Untersuchung (I) wurde es nochmals rektifiziert — $Sp._{18}$ = 100—103° — und erneut optisch untersucht (II).

I. $d_4^{15,3} = 0{,}8861$; daraus $d_4^{15,5} = 0{,}8859$. — $d_4^{20} = 0{,}882$. — $n_\alpha = 1{,}51112$, $n_D = 1{,}51532$, $n_\beta = 1{,}52786$, $n_\gamma = 1{,}53861$ bei 15,5°. — $n_D^{20} = 1{,}5133$.

II. $d_4^{15,4} = 0{,}8837$. — $d_4^{20} = 0{,}880$. — $n_\alpha = 1{,}51028$, $n_D = 1{,}51452$, $n_\beta = 1{,}52702$, $n_\gamma = 1{,}53796$ bei 15,4°. — $n_D^{20} = 1{,}5125$.

		M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{12}H_{18}$ (162,14)		53,68	54,01	1,12	1,80
Gef.	I	54,84	55,22	1,51	2,46
	II	54,90	55,29	1,51	2,49
E M (Mittel)		+ 1,19	+ 1,25	+ 0,39	+ 0,68
E Σ „		+ 0,73	+ 0,77	+ 35%	+ 38%

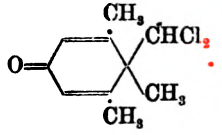
0,1217 g gaben 0,3930 CO_2 und 0,1207 H_2O.

Digitized by Google

	Ber. für $C_{12}H_{18}$	Gef.
C	88,8	88,1
H	11,2	11,1

Umlagerung. Auf Zusatz von Schwefelsäure zur Lösung des Semibenzols in Eisessig erwärmte sich das Gemisch von 14° auf 30°. Da damals noch nicht erkannt war, daß in manchen Fällen die Umlagerung erst bei höherer Temperatur vollständig wird, arbeitete man das entstandene Produkt sofort auf, erhielt aber ein bei 215—230° siedendes Öl, das noch unveränderte hydroaromatische Substanz enthielt. Wegen Substanzmangel mußte auf die Reinigung dieses Präparates und ebenso auf eine Wiederholung des Versuchs verzichtet werden.

Abkömmlinge des Ketons



1,2,6-Trimethyl-1-dichlormethylcyclohexadien-(2,5)-on-(4).

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung dieses noch nicht bekannten Ketons diente *Hemellithenol*, über dessen Gewinnung später berichtet werden wird.

Zu einer Auflösung von 80 g des Phenols in 400 ccm 30 prozentiger Natronlauge und 1100 ccm Wasser ließ man bei einer Außentemperatur von 80—90° im Laufe von 2—3 Stunden 130 ccm Chloroform tropfen, wobei man darauf achtete, daß das Gemisch stets lebhaft siedete. Zum Schluß wurde noch 1—2 Stunden bei einer Außentemperatur von 100° weiter gekocht. Aus der abgetrennten Chloroformschicht destillierte man das Lösungsmittel auf dem Wasserbad ab, erwärmte den Rückstand noch einige Zeit in einer offenen Schale und verrieb ihn dann mit 10 prozentiger Natronlauge. Hierbei schied sich das rohe Keton in Gestalt brauner, glänzender Blättchen ab, die mehrmals mit Natronlauge und Wasser waschen und dann auf Fließpapier an der Luft ge-

Digitized by Google

trocknet wurden. Aus je 80 g Hemellithenol wurden durchschnittlich 60 g von diesem Produkt gewonnen.

Da sich das rohe Keton bei der Destillation im Vakuum zum Teil zersetzt, mußte es durch Umkrystallisieren gereinigt werden. Man kochte es zu diesem Zweck erst mit Benzin vom Siedep. 80—100° unter Zusatz von Tierkohle aus, wobei man auf 120 g Rohprodukt 200 ccm Benzin nahm. Die dabei zurückbleibende zähe Masse wurde zweimal mit der Mutterlauge der beim Erkalten abgeschiedenen Krystalle ausgezogen. Zur weiteren Reinigung löste man das so erhaltene Produkt in wenig siedendem Benzol, filtrierte und versetzte das Filtrat in der Hitze mit Petroläther vom Siedep. 60° bis zur beginnenden Krystallisation. Nach Wiederholung der Operation war der Körper rein.

Die Verluste sind bei diesem Reinigungsverfahren leider ziemlich groß, denn aus 80 g Rohketon wurden nur 50 g reines Produkt gewonnen.

Die Verbindung scheidet sich aus dem angegebenen Gemisch oder aus Leichtbenzin vom Siedep. 70—100° bei langsamer Krystallisation in derben, farblosen Platten, bei raschem Abkühlen in weißen, schillernden Blättchen ab. Sie schmilzt bei 107,5—108,5° und ist in den meisten organischen Mitteln leicht löslich.

0,1460 g verbrauchten 13,3 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{10}H_{13}OCl_2$	Gef.
Cl	32,4	32,3

Das *Semicarbazon*, das leicht in der üblichen Weise aus dem Keton gewonnen wird, ist ein weißes Krystallpulver vom Schmelzp. 218° und ist in allen gebräuchlichen Mitteln, mit Ausnahme von Eisessig, schwer löslich. Zur Reinigung wurde es mit Alkohol ausgekocht.

0,1690 g verbrauchten 12,23 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{11}H_{15}ON_3Cl_2$	Gef.
Cl	25,7	25,6

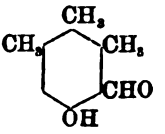
Das *p-Nitrophenylhydrazon* bildet sich gleichfalls sehr rasch, wenn man das Keton und salzsaures p-Nitro-

Digitized by Google

phenylhydrazin in Alkohol zusammenbringt. Der Körper bildet feine, rote Nädelchen und kann aus verdünnter Essigsäure oder aus wäßrigem Aceton umkrystallisiert werden. Von den meisten anderen Mitteln wird er sehr schwer oder gar nicht aufgenommen. Schmelzp. 190° bis 191°.

0,1124 g verbrauchten 6,27 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{16}H_{17}O_2N_2Cl_2$	Gef.
Cl	20,0	19,8

1,2,3-Trimethyl-5-oxybenzaldehyd-(6), 

In geringer Menge — etwa 5 g aus 50 g Phenol — entstand neben dem chlorhaltigen Keton dieser dreifach methylierte Salicylaldehyd. Er wurde aus dem alkalischen Filtrat vom Keton durch Säure in Freiheit gesetzt, mit Wasserdampf übergetrieben und durch zweimaliges Umkrystallisieren aus Alkohol auf konstanten Schmelzpunkt gebracht. Mit Natriumbisulfit schien sich der Aldehyd, wenn überhaupt, nur sehr schwer zu vereinigen.

Der Körper bildet schwach gelbliche, derbe Nadeln oder dünne Prismen und schmilzt bei 77—78°. Aus Methyl- oder Äthylalkohol und Leichtbenzin kann er bequem umkrystallisiert werden; in Benzol, Aceton und Chloroform ist er leicht löslich. Er siedet unzersetzt und gibt mit Eisenchlorid in alkoholischer Lösung eine intensive schmutzig-grüne Färbung, während sich das Hemellithenol mit diesem Reagens nur schwach grünlich färbt.

0,1572 g gaben 0,4212 CO_2 und 0,1056 H_2O.

	Ber. für $C_{10}H_{12}O_2$	Gef.
C	73,1	73,1
H	7,4	7,5

Das *Semicarbazon* bildet sich augenblicklich und ist ein weißes Krystallpulver, das sich in heißem Eisessig

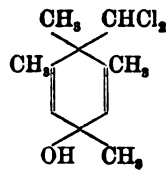
Digitized by Google

unter schwacher Zersetzung löst, im übrigen aber sehr schwer löslich ist. Zur Analyse wurde es erst mit Wasser und dann mit Alkohol ausgekocht. Es färbt sich bei 130° gelb und ist bei 280° noch nicht geschmolzen.

0,1059 g gaben 0,2320 CO_2 und 0,0675 H_2O.

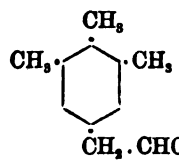
	Ber. für $C_{11}H_{15}O_2N_3$	Gef.
C	59,7	59,8
H	6,8	7,1

1,2,4,6-Tetramethyl-1-dichlormethyl-cyclohexadien-(2,5)-ol-(4),



und

1,2,3-Trimethyl-5-[β,β-dichlor]-äthylbenzol,



5 g des gechlorten Ketons in 150 ccm abs. Äther ließ man in der Kälte zu einer gleichen Lösung von Magnesiumjodmethyl — aus 7,6 g Jodmethyl und 1,2 g Magnesium — tropfen. Die gelben Schlieren, die sich anfangs bildeten, verschwanden beim Umschütteln, und schließlich schied sich das Anlagerungsprodukt in farblosen Krystallen ab. Man zersetzte es mit eiskalter Salmiaklösung, trocknete über Natriumsulfat und saugte am nächsten Morgen den Äther in einem Strom trockner Luft ab. Das *Carbinol* spaltete jedoch hierbei bereits zum Teil Wasser ab und blieb ölig.

Man erhitzte das Produkt daher auf dem Wasserbad, um die Wasserabspaltung zu vollenden und das gechlorte Semibenzol in das aromatische Isomere umzulagern. Das entstandene *Chlorid,* dem nach Analogien die oben stehende Formel zu erteilen ist, siedete unter 19 mm Druck bei 155—159°. Sein Verhalten gegen Kaliumpermanganat und die Chlorbestimmungen deuteten

Digitized by Google

darauf hin, daß bei dem Umlagerungsprozeß ein wenig Chlorwasserstoff abgespaltet worden war, immerhin war die Substanz, ein gelbliches Öl, annähernd rein.

I. 0,1756 g verbrauchten 15,75 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.
II. 0,1335 g „ 11,9 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{11}H_{14}Cl_2$	Gef. I	Gef. II
Cl	32,6	31,8	31,7

$d_4^{21,8} = 1{,}1424$. — $d_4^{20} = 1{,}144$. — $n_\alpha = 1{,}53900$, $n_D = 1{,}54310$, $n_\beta = 1{,}55494$. — $n_D^{20} = 1{,}5439$.

	M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{14}Cl_2$ (217,03)	58,76	59,18	1,22
Gef.	59,51	59,89	1,46
EM	+0,75	+0,76	+0,24
EΣ	+0,35	+0,35	+20%

Die spektrochemischen Werte beweisen, daß eine aromatische Verbindung vorlag.

1,1,2,4,6-Pentamethylcyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (IX) und *1,1,2,6-Tetramethyl-4-methencyclohexadien-(2,5)* (XVII).

Gechlortes Carbinol aus 34 g Keton, 53,2 g Jodmethyl und 8,4 g Magnesium wurde in 2—2,5 Liter feuchtem Äther mit 50 g Natriumdraht reduziert. Bei der Destillation des Reaktionsproduktes unter 14 mm Druck fing man folgende Fraktionen auf:

I. 80—91°. II. 91—105°. III. 105—107°, wenig.

Beim nochmaligen Durchfraktionieren siedete der größte Teil unter 13 mm Druck konstant bei 97—98°. Trotz des guten Siedepunktes bewiesen sowohl die Analyse, wie die optische Untersuchung, daß das Produkt ein Gemisch von Carbinol und Kohlenwasserstoff war. Es wurde daher durch 20 Minuten langes Schütteln mit eiskalter Schwefelsäure ganz in das *Semibenzolderivat* übergeführt. Bei der Vakuumdestillation ging die Hauptmenge unter 15 mm Druck bei 92—93° über; Vor- und Nachlauf waren unbedeutend, auch im Kolben blieb nur

Digitized by Google

ein geringer harziger Rückstand. Die Hauptfraktion wurde optisch untersucht (I).

Die Analyse gab etwas zu niedrige Werte.

0,1577 g gaben 0,5117 CO_2 und 0,1463 H_2O.

	Ber. für $C_{11}H_{16}$	Gef.
C	89,1	88,5
H	10,9	10,4

Da das Präparat möglicherweise noch einen Rest von Carbinol enthalten konnte, wurde es nochmals 10 Minuten mit Schwefelsäure geschüttelt, rektifiziert — $Sp._{15} = 89—90^0$ — und erneut untersucht (II). Die jetzt gefundenen Konstanten wichen von den ersten Beobachtungen nur wenig ab.

I. $d_4^{21,8} = 0{,}8798$. — $d_4^{20} = 0{,}881$. — $n_\alpha = 1{,}51118$, $n_D = 1{,}51587$, $n_\beta = 1{,}52903$, $n_\gamma = 1{,}54064$ bei 21,8°. — $n_D^{20} = 1{,}5167$.

II. $d_4^{23,3} = 0{,}8765$; daraus $d_4^{23,2} = 0{,}8766$. — $d_4^{20} = 0{,}879$. — $n_\alpha = 1{,}50884$, $n_D = 1{,}51350$, $n_\beta = 1{,}52660$, $n_\gamma = 1{,}53880$ bei 23,2°. — $n_D^{20} = 1{,}5149$.

		M_α	M_D	$M_\beta - M_\alpha$	$M_\gamma - M_\alpha$
Ber. für $C_{11}H_{16}$ (148,13)		49,08	49,40	1,05	1,68
Gef.	I	50,46	50,85	1,47	2,42
	II	50,44	50,83	1,48	2,44
EM (Mittel)		+1,37	+1,44	+0,48	+0,75
EΣ	„	+0,92	+0,97	+41%	+45%

Umlagerung in Pentamethylbenzol. Zur Umlagerung wurde das Semibenzolderivat mit Eisessig und Schwefelsäure $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbad erwärmt und dann noch $^1/_4$ Stunde zum Sieden erhitzt. Das Reaktionsprodukt siedete bei 210—230° und erstarrte in einer Kältemischung, wurde aber bei Zimmertemperatur wieder flüssig. Da es eine hydroaromatische Beimengung enthielt, und eine fraktionierte Destillation bei der geringen Substanzmenge für die Reinigung keinen Erfolg versprach, wurde das Produkt mit einer gesättigten alkoholischen Pikrinsäurelösung versetzt. Alsbald schieden sich gelbe Nädelchen aus, die bei 123° erweichten und bei 125° geschmolzen waren. Genau so verhielt sich das

Digitized by Google

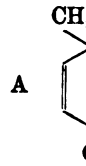
aus einem Vergleichspräparat von Pentamethylbenzol hergestellte *Pikrat*; auch die Mischung beider Proben zeigte denselben Schmelzpunkt. Jacobsen[1]) gibt für diese Verbindung den etwas höheren Schmelzpunkt 131° an.

Durch Natronlauge wurde aus der Pikrinsäureverbindung der Kohlenwasserstoff in Freiheit gesetzt. Das so gewonnene *Pentamethylbenzol* schmolz ohne weitere Reinigung bei 50—51°, ebenso das Vergleichspräparat und eine Mischung von beiden. Nach Jacobsen (a. a. O.) liegt der Schmelzpunkt des reinen Körpers bei 51,5°.

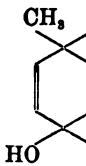
II. Über Carbonsäuren der Semibenzolgruppe;

von *K. v. Auwers* und *K. Ziegler.*

Es ist früher[2]) gezeigt worden, daß das *gechlorte hydraromatische Keton* A sich mit Zink und Bromessigester zu dem *Oxycarbonsäureester* B kondensieren läßt. Verliert dieser Ester Wasser, so entsteht das *Semibenzolderivat* C, das bei höherer Temperatur die charakteristische Umlagerung der chlorierten Semibenzole erleidet, indem es in den *aromatischen Ester* D übergeht. Auch die zugehörigen drei Säuren, die sich analog ihren Estern verhalten, konnten gewonnen werden.



A ,

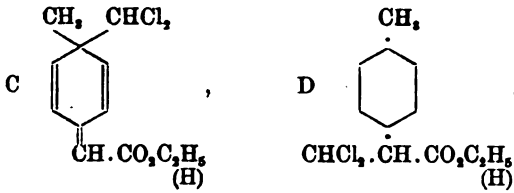


B ,

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. 20, 898 (1887).

[2]) Auwers, Ber. d. d. chem. Ges. 44, 588 (1911).

Digitized by Google



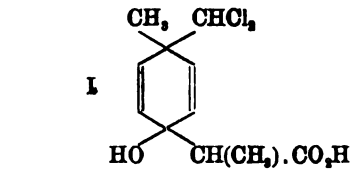
Da diese Reihenfolge von Reaktionen bis jetzt nur an diesem einen Beispiel durchgeführt worden ist, war es wünschenswert zu prüfen, ob sie allgemeiner Natur ist. Ferner sollte versucht werden, die entsprechenden halogenfreien Verbindungen zu gewinnen, um festzustellen, ob sie sich bei ihrer Umlagerung ebenso charakteristisch von ihren Halogenderivaten unterschieden, wie dies für die Kohlenwasserstoffe nachgewiesen worden ist. (Vgl. die voranstehende Mitteilung.)

Dieses zweite Ziel ist, wie vorweg bemerkt sein möge, bis jetzt noch nicht erreicht worden, denn die Reduktionsversuche, bei denen man die Ester der gechlorten Oxycarbonsäuren mit Natrium und feuchtem Äther behandelte, lieferten regelmäßig nur harzige, schmierige Massen, aus denen keine gut charakterisierte Verbindung gewonnen werden konnte. Diese Versuche sind daher vorläufig abgebrochen worden.

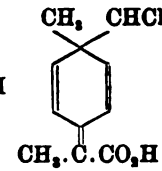
Dagegen konnten einige *homologe gechlorte Semibenzolcarbonsäuren* gewonnen werden, wobei neben Ähnlichkeiten auch Abweichungen von den früher untersuchten Verbindungen festgestellt wurden.

Aus dem Keton A entsteht mit Zink und α-Brompropionsäureester der *Äthylester* der *α-[1-Methyl-1-dichlormethyl-4-oxy]-propionsäure-(4)*, ein dickes, dunkles Öl, das nur in unreinem Zustand gewonnen wurde, da es bei der Destillation im Vakuum zu leicht Wasser abspaltete. Durch Verseifung mit Alkali in der Kälte erhält man aus ihm die *freie Säure* (I), die sich durch Umkrystallisieren reinigen läßt und bei 123° schmilzt. Bei längerem Stehen zersetzt sich die Säure; beim Erhitzen tritt die Zersetzung sofort ein.

Digitized by Google

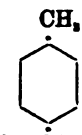


I

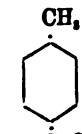


II

III



IV



V

Durch Erwärmen kann man aus dem Ester der Oxysäure das zugehörige Semibenzolderivat nicht gewinnen, da unter diesen Bedingungen das Produkt der Wasserabspaltung sich sogleich unter lebhaftem Aufsieden in das aromatische Isomere umwandelt. Dagegen kann man dem Ester durch Schütteln mit Ameisensäure ohne weitere Veränderung Wasser entziehen und aus dem entstandenen dreifach ungesättigten Ester durch vorsichtige Verseifung die *1-Methyl-1-dichlormethyl-4-äthen-*[*α-carbonsäure*] (II) darstellen. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 101—103°.

Beim Schmelzen lagert sie sich unter Aufsieden und schwacher Entwicklung von Kohlendioxyd in die *α-*[*p-Tolyl*]*-β,β-dichlorisobuttersäure* (III) um. Auch beim längeren Erwärmen auf dem Wasserbad oder durch längeres Kochen einer Lösung der hydroaromatischen Säure in Schwerbenzin tritt diese Umwandlung ein. Am besten erhitzt man aber zu diesem Zweck die eben genannte Lösung im Rohr auf 140—150°. Jedoch konnte auf keine Weise eine so glatte Umlagerung bewirkt werden, wie sie bei dem niedrigeren Homologen möglich ist, denn es bildeten sich neben der gewünschten Säure regelmäßig ölige und schmierige Substanzen, die zum größten Teil aus dem aromatischen Dichlorid IV bestanden. Vermutlich wird die tertiär gebundene Carboxylgruppe leichter abgespaltet als das in sekundärer Bindung befindliche Carboxyl des entsprechenden Propionsäurederivates.

Digitized by Google

Das Umlagerungsprodukt krystallisiert in Nadeln vom Schmelzp. 135—136° und ist, wie die homologe Verbindung, sehr empfindlich gegen Alkali, denn sowohl durch Natronlauge wie durch Soda wird es alsbald in das *α,p-Dimethyl-β-chlorstyrol* (V) verwandelt. Man kann daher die Säure nicht durch alkalische Verseifung ihres durch Umlagerung leicht erhältlichen *Esters* gewinnen. Aber auch mit Säuren gelang eine glatte Verseifung dieses Esters nicht, denn wäßrige Salzsäure griff ihn nicht merklich an, und beim Kochen mit alkoholischer Salzsäure entstanden stets schmierige Produkte. Man ist daher vorläufig für die Darstellung der aromatischen Säure auf die unbequeme und wenig ergiebige Methode angewiesen, die auf der Umlagerung der freien hydroaromatischen Säure beruht.

Um die Konstitution der aromatischen Säure sicher zu beweisen, wäre es erwünscht gewesen, das bei ihrem Abbau entstehende Styrolderivat durch Oxydation in *Methyl-p-tolylketon* verwandeln zu können. Die vorhandene Menge reichte jedoch hierzu nicht aus, und so begnügte man sich damit, daß der Chlorgehalt, die ungesättigte Natur und der charakteristische Geruch dieses Abbauprodukt unzweifelhaft als ein Styrol erkennen ließen, und damit indirekt auch die Struktur der Säure festgelegt war.

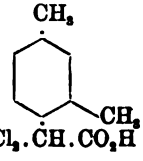
Sehr merkwürdige Erfahrungen machten wir bei Versuchen, das Keton A mit Zink und *α-Bromisobuttersäureester* zu kondensieren und aus diesem Produkt Wasser abzuspalten. Bei den ersten Versuchen trat eine Reaktion zwischen den Komponenten ein, die aber plötzlich in eine explosionsartige Zersetzung überging. Bei späteren, in kleinerem Maßstab angestellten Versuchen gelang es zwar, die Reaktion ohne Unfall zu Ende zu führen, doch ließ sich aus den geringen Mengen des Reaktionsgemisches keine einheitliche Substanz isolieren. Als aber größere Mengen Material dargestellt werden sollten, versagte die Kondensation gänzlich, denn trotz aller

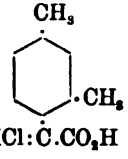
Digitized by Google

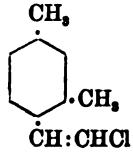
Kunstgriffe und Abänderungsversuche wurde das Zink von dem Gemisch des Ketons und des bromierten Esters nicht angegriffen. Ähnliche Schwierigkeiten waren auch bei der Kondensation des Ketons mit α-Brompropionsäureester aufgetreten (vgl. experimentellen Teil), hatten sich da aber überwinden lassen. Da die Reaktion mit α-Bromisobuttersäureester nicht erzwungen werden konnte, haben wir diesen Versuch fürs erste aufgegeben, gedenken aber auf ihn zurückzukommen, da es von Interesse ist festzustellen, wie sich das erwartete Kondensationsprodukt, das nicht in der gewöhnlichen Weise Wasser abspalten kann, beim Erhitzen oder bei der Behandlung mit wasserentziehenden Mitteln verhalten wird.

Um zu prüfen, ob sich aus den *höheren gechlorten Ketonen* Säuren der Semibenzolgruppe gewinnen lassen, untersuchte man die Einwirkung von Zink und *Bromessigester* auf das aus dem *as. m-Xylenol* erhältliche Keton. Die Reaktion verlief in normaler Weise, jedoch entstand an Stelle des sehr unbeständigen Oxycarbonsäureesters sofort das Semibenzolderivat, der *1,3-Dimethyl-1-dichlormethyl-cyclohexadien-(2,5)-methencarbonsäureäthylester-(4)*, der ein dickes, dunkelgefärbtes Öl darstellte. Aus ihm kann man durch Verseifung leicht die *freie Säure* (VI) gewinnen, die bei 125—126° schmilzt.

VI

VII 

VIII 

IX 

Sowohl die Säure wie ihr Ester zeichnen sich durch eine für derartige Semibenzolderivate *ungewöhnliche Be-*

Digitized by Google

ständigkeit aus. Erst bei 150—160° lagert sich der Ester mit merklicher Geschwindigkeit in die isomere aromatische Verbindung um. Die freie Säure bleibt bei stundenlangem Erwärmen auf dem siedenden Wasserbade unverändert, zersetzt sich nicht beim Schmelzen und läßt sich aus Benzin vom Siedep. 110—120° umkrystallisieren. Ein Präparat, das 2 Jahre aufbewahrt worden ist, hat sein Aussehen gar nicht und seinen Schmelzpunkt kaum verändert. Als eine Probe in Benzin 4 Stunden gekocht wurde, war sie nur zum geringen Teil umgelagert worden, dagegen vollständig, als auf 150° erhitzt wurde. Erst bei noch höherer Temperatur zeigt die Säure die charakteristische Umlagerung unter Aufsieden.

Die dabei entstehende Säure, die *α-[as. m-Xylyl]-β,β-dichlorpropionsäure* (VII) ist eine gut krystallisierte Verbindung vom Schmelzp. 132—133,5°; ihr *Ester*, der durch Erhitzen des hydroaromatischen Esters und darauf folgende Vakuumdestillation gewonnen werden kann, ein farbloses Öl, das unter 17 mm Druck bei 170—175° siedet.

Entsprechend ihrer Konstitution wird die aromatische Säure von Alkalien leicht angegriffen. Durch *Natronlauge* wird sie in die *2,4-Dimethyl-β-chloratropasäure* (VIII), die bei 111° schmilzt, verwandelt, durch *Soda* in das *2,4-Dimethyl-β-chlorstyrol* (IX).

Die Konstitution des Styrolderivates wurde durch Oxydation zum *as. m-Xylylaldehyd* bewiesen, der durch sein Semicarbazon vom Schmelzp. 226° und durch die Mischprobe mit einem Vergleichspräparat des Semicarbazons identifiziert wurde.

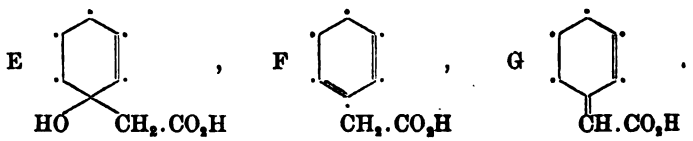
Damit ist auch die Struktur sowohl der gesättigten, wie der ungesättigten aromatischen Säure bewiesen.

Nach diesen Versuchen wird man annehmen dürfen, daß sich jene gechlorten Ketone allgemein mit passenden Bromfettsäureestern kondensieren und weiter in Semibenzolcarbonsäuren überführen lassen. Daß die dabei zunächst entstehenden Oxycarbonsäureester in ungleichem

Digitized by Google

Maße zur Wasserabspaltung neigen, ist nicht auffallend, da ähnliche Unterschiede auch bei anderen hydroaromatischen Oxyverbindungen beobachtet worden sind.

Interessanter sind die großen Gegensätze in der Beständigkeit der einzelnen Carbonsäuren der Semibenzole, denn eine Haltbarkeit, wie die der zuletzt besprochenen Säure, war bisher bei Semibenzolderivaten nicht bekannt. Es erinnert dies an die Tatsache, daß bei der Abspaltung von Wasser aus Oxysäuren von der Form E nach den bisherigen Beobachtungen[1]) nicht die rein endocyclisch-ungesättigten Substanzen F entstehen, sondern die sehr beständigen Körper G mit einer semicyclischen Doppelbindung.



Es besteht somit eine deutliche Neigung zur Bildung solcher Säuren mit einem endo-semicyclischen System von Doppelbindungen, die so groß ist, daß sie unter Umständen sogar dem so ausgeprägten Bestreben hydroaromatischer Substanzen zur Umlagerung in Benzolderivate bis zu einem gewissen Grade das Gleichgewicht halten kann.

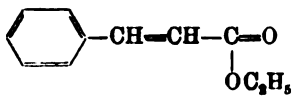
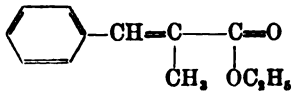
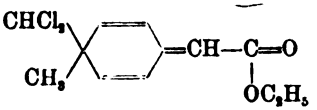
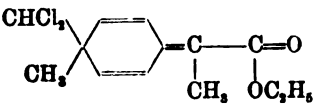
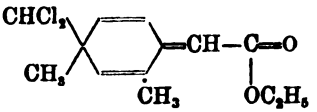
Zum Schluß noch ein Wort über die *Spektrochemie* dieser Verbindungen! Da die direkt gewonnenen Präparate der Semibenzolcarbonsäureester nicht genügend rein waren, wurden für die optische Untersuchung besondere Proben aus den Silbersalzen der reinen Säuren dargestellt. Doch auch diese Präparate waren so stark gelb gefärbt, daß an ihnen nur die Refraktion, nicht die Dispersion bestimmt werden konnte.

Im folgenden stellen wir die spezifischen Exaltationen dieser Substanzen mit denen ähnlich gebauter Verbindungen zusammen.

---

[1]) Auwers u. Peters, Ber. d. d. chem. Ges. 43, 3094 (1910).

Digitized by Google

Nr.	Formel	$E\Sigma_\alpha$	$E\Sigma_D$	$E\Sigma_\beta - \Sigma_\alpha$
1		+1,95	+2,10	+92 %
2		+1,60	+1,72	+72 %
3		+1,79	+1,92	+117 %
4		+1,58	+1,68	—
5		+1,67	+1.79	—

Alle diese Substanzen haben eine gehäufte Konjugation, und daher haben sie alle starke Exaltationen von ähnlicher Höhe. Auf Einzelheiten der Zahlen wollen wir hier nicht eingehen, nur machen wir darauf aufmerksam, daß der Einfluß eines Methyls als „störenden" Substituenten (Nr. 2, 4 und 5) bei diesen Körpern verhältnismäßig schwach ist. Daß der Eintritt eines Methyls in den Ring (Nr. 5) die geringste deprimierende Wirkung ausübt, hängt mit den besonderen Verhältnissen cyclischer Verbindungen zusammen. (Vgl. die voranstehende Mitteilung.)

Experimenteller Teil.

α-[1-Methyl-1-dichlormethyl-cyclohexadien-(2,5)-ol-(4)]-propionsäure (I).

Je 19 g des gechlorten Ketons aus p-Kresol (A), 18 g α-Brompropionsäureäthylester und 6,6 g Zinkspäne wurden mit 100 ccm trockenem Benzol gemischt und

Digitized by Google

unter Rückfluß gekocht. Die einzelnen Ansätze, die auf genau die gleiche Weise hergestellt wurden, und bei denen jede Spur von Feuchtigkeit nach Möglichkeit ausgeschlossen worden war, verhielten sich recht verschieden. Bald begann die Reaktion von selbst unter lebhaftem Aufsieden und ging bis zum Schluß gleichförmig weiter; bald mußte zu ihrer Fortführung andauernd erhitzt werden; bald setzte sie erst nach stundenlangem Kochen ein und verlief träge; ja in zwei Fällen konnte überhaupt keine Umsetzung erzielt werden. Alle Hilfsmittel, wie erneutes Anätzen oder Amalgamieren des Zinks, Zusatz von etwas Jod, sorgfältiges Rektifizieren der Ausgangsmaterialien nützten nichts. Endlich wurde der Grund des Mißerfolgs in der Beschaffenheit des angewandten Benzols erkannt, denn als reines, thiophenfreies Benzol verwendet wurde, verlief die Reaktion sofort normal. Schwefel oder schwefelhaltige Verbindungen scheinen also, ähnlich wie bei katalytischen Hydrierungen, auch hier als Kontaktgifte wirken zu können. Doch muß bemerkt werden, daß in vielen Fällen auch mit gewöhnlichem, trockenem Teerbenzol glatte Umsetzung stattfand. Sobald alles Zink aufgebraucht war, unterbrach man das Erhitzen sofort, denn bei weiterem Kochen kam es vor, daß der Oxycarbonsäureester Wasser abspaltete, und darauf explosionsartig die Umlagerung in den Ester der aromatischen Säure erfolgte. Nach vollendeter Umsetzung wurde die Zinkdoppelverbindung durch Schütteln der benzolischen Lösung mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt; darauf hob man die benzolische Schicht ab, goß sie durch ein trockenes Filter und trocknete sie über geglühtem Natriumsulfat. Nach dem Absaugen des Benzols im Vakuum bei 50—70° blieb der *Ester der Oxysäure* als dickes, dunkles Öl in einer Ausbeute von 20—25 g zurück.

Zur *Verseifung* gab man zu dem Ester eine konzentrierte alkoholische Lösung der vierfach molekularen Menge Ätzkali und ließ das Gemisch 2 Tage bei Zimmer-

Digitized by Google

temperatur stehen. Die Hauptmenge des Alkohols wurde darauf unter Erwärmen auf 40—50° abgesaugt und der Rückstand in Wasser gegossen; hierbei schied sich etwas unverbrauchtes Keton ab, das mit Äther entfernt wurde. Nun säuerte man mit verdünnter Schwefelsäure unter Eiskühlung vorsichtig an, nahm die ölig abgeschiedene Oxysäure in Äther auf, trocknete über Natriumsulfat und saugte schließlich den Äther im Vakuum ab. Die Säure hinterblieb als eine mit etwas Öl durchtränkte Krystallmasse und wurde erst mit Benzol verrieben und dann aus diesem Mittel, in dem sie auch in der Hitze nur mäßig löslich ist, umkrystallisiert.

Die *Oxysäure* bildet derbe, weiße Krystalle und schmilzt unter völliger Zersetzung bei 123°. Beim Aufbewahren verschmiert die Säure rasch.

0,1881 g gaben nach Carius 0,2018 g AgCl.

	Ber. für $C_{11}H_{14}O_3Cl_2$	Gef.
Cl	26,8	26,5

1-Methyl-1-dichlormethylcyclohexadien-(2,5)-äthen-[α-carbonsäure]-(4) (II).

Den *Ester* dieser Säure erhält man, wenn man den rohen Ester der Oxysäure mit der 5fachen Menge hochprozentiger Ameisensäure schüttelt. Zuerst ist das Gemisch eine klare Lösung; bald aber scheidet sich der schwerer lösliche dreifach ungesättigte Ester als Öl ab. Man schüttelt noch kurze Zeit weiter, gießt dann in Wasser, nimmt das Reaktionsprodukt in Äther auf, trocknet und saugt den Äther vorsichtig ab. Das zurückbleibende dunkle Öl wird durch 24stündiges Stehenlassen mit der doppelt molekularen Menge Ätzkali in konzentrierter alkoholischer Lösung verseift. Beim Verdünnen mit Wasser scheidet sich eine geringe Menge unveränderten Ketons aus, das man in Äther aufnimmt; aus der abgetrennten alkalischen Lösung fällt beim Ansäuern die *freie Säure* als Öl aus, das man in ätherischer Lösung über Chlorcalcium trocknet. Nach dem Absaugen des

Digitized by Google

Äthers im Vakuum bleibt die Substanz als mehr oder weniger dunkel gefärbtes Öl zurück, das meist von selbst, sonst beim Verreiben mit Petroläther erstarrt. Da die Säure ziemlich unbeständig ist, vermeidet man zweckmäßig beim Umkrystallisieren längeres und höheres Erhitzen; empfehlenswert ist, das Rohprodukt auf Ton abzupressen und dann zweimal aus verdünntem, 60—70° warmem Methylalkohol umzukrystallisieren.

Die Ausbeuten an reiner Säure waren sehr wechselnd, denn bei völlig gleicher Arbeitsweise wurden aus 19 g Keton im einen Fall 9 g Säure, im anderen nur 3,5 g erhalten.

Die *Säure* stellt ein meist etwas gelblich gefärbtes Krystallpulver dar, das bei 101—103° schmilzt und sich dabei in die isomere aromatische Verbindung umlagert. In Alkohol und Eisessig ist sie leicht löslich, in Petroläther und kaltem Benzol schwer.

0,2576 g verbrauchten 20,75 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{11}H_{12}O_2Cl_2$	Gef.
Cl	28,7	28,6

Das *Silbersalz* der Säure scheidet sich als weißer, pulveriger Niederschlag ab, wenn man zu einer Lösung der Säure in der berechneten Menge Ammoniak Silbernitrat setzt. Schmierige Nebenprodukte werden durch gründliches Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther entfernt.

Zur Umwandlung in den reinen *Äthylester* wurde das Salz $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde in absolut ätherischer Aufschlämmung mit Jodäthyl geschüttelt. Das Filtrat vom Jodsilber wusch man mit Natriumthiosulfat, Soda und Wasser, trocknete die Lösung über Chlorcalcium und saugte im Vakuum bei 30—40° so lange Luft durch, bis der Rückstand nicht mehr an Gewicht verlor.

Das Präparat stellte ein dickes, gelbes Öl dar, mit dem die folgenden Bestimmungen ausgeführt wurden.

0,2626 g verbrauchten 19,0 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{13}H_{16}O_2Cl_2$	Gef.
M		
Cl	25,8	25,6

Digitized by Google

$d_4^{17,6} = 1{,}2033$. — $d_4^{20} = 1{,}201$. — $n_\alpha = 1{,}56017$, $n_D = 1{,}56682$ bei 17,6°. — $n_D^{20} = 1{,}5657$.

	M_α	M_D
Ber. für $C_{13}H_{16}O^{\cdot}O''Cl_2\Gamma_3$ (275,04)	69,60	70,02
Gef.	73,93	74,65
EM	+4,33	+4,63
EΣ	+1,58	+1,68

α-[p-Tolyl]-β,β-dichlorisobuttersäure (III).

Erhitzt man die eben beschriebene Säure im Reagenzglas bis zum Schmelzen, so siedet sie auf und lagert sich in das aromatische Isomere um, jedoch wird dabei zum großen Teil Kohlendioxyd abgespaltet. Milder verläuft die Umlagerung, wenn man die Säure längere Zeit auf dem Wasserbad erwärmt oder sie, was am meisten zu empfehlen ist, mit Benzin vom Siedep. 110—120° im Rohr $^1/_2$ Stunde auf 140—150° erhitzt. Jedoch verläuft in keinem Fall die Umwandlung glatt, vielmehr erhält man in der Regel dicke, harzige Massen, die erst beim Verreiben mit Petroläther ein festes Pulver absondern. Man streicht auf Ton und zieht aus dem Produkt die Säure durch kochendes Benzin aus.

Die Substanz ist in den gewöhnlichen organischen Mitteln leicht löslich und kann aus niedrigsiedendem Petroläther umkrystallisiert werden. Sie bildet hübsche, farblose, sternförmig verwachsene Nädelchen, die bei 135—136° schmelzen.

0,0941 g verbrauchten 7,6 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{11}H_{12}O_2Cl_2$	Gef.
Cl	28,7	28,6

Über das Verhalten gegen Alkali ist bereits im allgemeinen Teil berichtet worden.

1,3-Dimethyl-1-dichlormethylcyclohexadien-(2,5)-methencarbonsäure-(4) (VI).

Der Ester dieser Säure bildete sich direkt bei der Kondensation von hydroaromatischem gechlortem Keton aus *as.* m-Xylenol, Zink und Bromessigester. Angewandt

Digitized by Google

wurden regelmäßig 20,4 g Keton, 16 g Bromessigsäureäthylester, 6,6 g Zinkspäne und 100 ccm trocknes Benzol. Die Umsetzung verlief bei dauerndem Erwärmen regelmäßig und pflegte nach 3 Stunden vollendet zu sein. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches geschah in der bereits beschriebenen Weise; die Ausbeute an Rohprodukt betrug gleichfalls 20—25 g.

Um etwa noch vorhandenen Oxycarbonsäureester zu zerstören, schüttelte man das dunkle Öl $^1/_2$ Stunde mit Ameisensäure; dann wurde der Ester durch alkoholische Lauge verseift. Auch in diesem Fall schied sich die rohe Säure zunächst als Öl ab, wurde aber nach Entfernung des Äthers sofort fest. Man verrieb den Rückstand mit wenig kaltem Methylalkohol und krystallisierte ihn dann aus demselben Mittel um. Die Ausbeuten waren verhältnismäßig gut; beispielsweise wurden aus 20,4 g Keton 7,5 g reine Säure gewonnen.

Aus Methylalkohol scheidet sich die Verbindung als weißes Krystallpulver ab, aus Benzin (Siedep. 110—120°), das sich auch als Krystallisationsmittel eignet, in blätterigen, zu Warzen verwachsenen Kryställchen. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 125—126°.

0,0534 g verbrauchten 4,32 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{11}H_{19}O_3Cl_2$	Gef.
Cl	28,7	28,7

Eine Probe des reinen *Äthylesters* der Säure wurde gleichfalls aus dem Silbersalz und Jodäthyl dargestellt. 4 g Salz waren in diesem Fall erst nach 10stündigem Schütteln und Stehen über Nacht völlig umgesetzt.

Auch dieser Ester wurde als dickes, gelbes Öl erhalten.

0,1964 g verbrauchten 14,3 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{13}H_{23}O_3Cl_2$	Gef.
Cl	25,8	25,8

$d_4^{17,6} = 1{,}2026$. — $d_4^{20} = 1{,}200$. — $n_\alpha = 1{,}56219$, $n_D = 1{,}56898$ bei 17,6°. — $n_D^{20} = 1{,}5679$ bei 20°.

Digitized by Google

	M_α	M_D
Ber. für $C_{18}H_{16}O^{\cdot}O''Cl_2\overline{\ }_3$ (275,04)	69,60	70,02
Gef.	74,19	74,93
EM	+4,59	+4,91
EΣ	+1,67	+1,79

α-[as. m-Xylyl]-β,β-dichlorpropionsäure (VII).

Die Umlagerung des Semibenzolderivates in diese Säure verlief am besten, wenn man sie in Benzin (Siedepunkt 110—120°) $^1/_2$ Stunde im Rohr auf 150—160° erhitzte. Kochen in Xylol lieferte keine guten Ergebnisse.

Beim Verdunsten der Benzinlösung schied sich die Säure in großen, derben, flachen Prismen aus, die etwas bräunlich gefärbt waren und diese Färbung auch bei längerem Kochen mit Tierkohle behielten. Der Körper ist leicht löslich in Methyl-, und Äthylalkohol, sowie Aceton, mäßig in Petroläther. Aus diesem Mittel wurde er in schwach gelblich gefärbten Krystallen gewonnen. Er schmilzt bei 132—133,5°.

0,1142 g verbrauchten 9,2 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{11}H_{12}O_2Cl_2$	Gef.
Cl	28,7	28,6

Kochende Sodalösung verwandelte die Säure in das *2,4-Dimethyl-β-chlorstyrol* (IX). Das Produkt siedete unter 14 mm Druck in der Hauptsache bei 115—120°, was zu der Literaturangabe[1]) $Sp._{14}$ = 117—120° stimmt. Das Styrol wurde in wäßrigem Aceton mit der berechneten Menge Kaliumpermanganat oxydiert; Wasserdampf trieb aus dem Reaktionsprodukt ein Gemisch eines Öles und eines festen Körpers über. Das Öl wurde an seinem bei 226° schmelzenden *Semicarbazon* mit Hilfe eines Vergleichspräparates leicht als der bekannte *2,4-Dimethylbenzaldehyd* erkannt. Der farblose, feste Körper schmolz bei 86—87°, war keine Säure und erwies sich als chlorhaltig; wegen der geringen Menge konnte seine Natur nicht festgestellt werden.

[1]) Auwers u. Köckritz, diese Annalen 352, 293 (1907).

Digitized by Google

Der *Äthylester* der Xylyldichlorpropionsäure wird am besten durch Umlagerung aus dem isomeren hydroaromatischen Ester gewonnen und durch darauf folgende Destillation im Vakuum gereinigt. Die Umlagerung findet zwischen 150° und 160° lebhaft statt und ist bei 170° vollendet. Bei der Rektifikation erhielt man erst einen Vorlauf, der neben etwas Ausgangsketon vermutlich auch Dimethyl-β-chloratropasäureester enthielt, der durch Abspaltung von Chlorwasserstoff bei der Umlagerung entstanden war. Dann folgte das normale Umlagerungsprodukt, das in der Hauptsache bei 170—175° unter 16 mm Druck überging.

0,1548 g verbrauchten 11,4 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{13}H_{16}O_2Cl_2$	Gef.
Cl	25,8	26,1

2,4-Dimethyl-β-chloratropasäure (VIII).

Diese Säure wurde durch kurzes Kochen des zweifach gechlorten gesättigten Esters mit überschüssiger alkoholischer Lauge gewonnen. Man dunstete den Alkohol ab, verdünnte mit Wasser, säuerte mit Schwefelsäure an und trocknete die ölig abgeschiedene Säure in ätherischer Lösung mit Chlorcalcium. Nach dem Verjagen des Äthers blieb ein Öl zurück, das nach einiger Zeit erstarrte. Man preßte das Produkt auf Ton ab, befreite es durch Verreiben mit ganz niedrig siedendem Petroläther nach Möglichkeit von anhaftenden Schmieren und krystallisierte es schließlich mehrfach aus diesem Mittel um.

Die Säure scheidet sich in farblosen, derben, verwachsenen Tafeln aus, ist in allen gebräuchlichen organischen Mitteln leicht löslich und schmilzt bei 111°.

0,0982 g verbrauchten 4,7 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

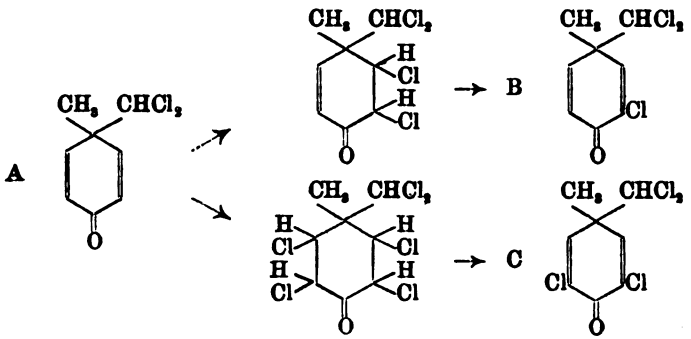
	Ber. für $C_{11}H_{11}O_2Cl$	Gef.
Cl	16,8	17,0

Digitized by Google

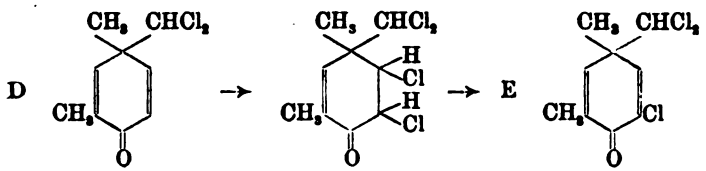
III. Über Chlor- und Bromderivate alkylierter Cyclohexadienone;

von *K. v. Auwers* und *K. Ziegler*.

Frühere[1]) Untersuchungen haben ergeben, daß das Keton A je nach den Versuchsbedingungen ein oder zwei Moleküle Chlor anzulagern vermag, und durch Abspaltung von Chlorwasserstoff aus den primären Verbindungen Mono- und Bisubstitutionsprodukte vom Schema B und C entstehen:



Dagegen nahm das Keton D nur *ein* Molekül Chlor auf und lieferte als Endprodukt der Reaktion das Monochlorderivat E.



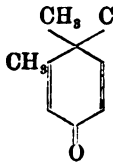
Man konnte daraus entnehmen, daß ein zum Carbonyl *ortho*-ständiger Substituent die Anlagerung von Chlor an die betreffende Doppelbindung verhindert, und daß bei der Abspaltung von Chlorwasserstoff regelmäßig *ortho*-Chlorsubstitutionsprodukte entstehen.

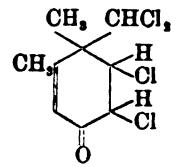
[1]) Auwers, Ber. d. d. chem. Ges. 44, 788 (1911).

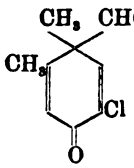
Digitized by Google

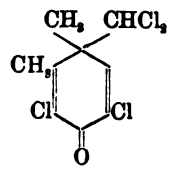
Zur Vervollständigung dieser Untersuchung war in erster Linie festzustellen, ob auch ein *Substituent in meta-Stellung* zum Carbonyl ebenso wirke wie ein *ortho*-Substituent; ferner war zu prüfen, ob für die *Bromierung* dieser Ketone die gleichen Regelmäßigkeiten gelten.

Um die erste Frage zu entscheiden, haben wir zunächst das Keton F der Einwirkung von Chlor unterworfen.

F 

I 

II 

III 

Leitet man Chlor einige Stunden durch eine Lösung des Ketons in Schwefelkohlenstoff, so erhält man das *Dichlorid* I, das bei 82—83° schmilzt und durch Kaliumacetat in heißer essigsaurer Lösung leicht und glatt in das *Monosubstitutionsprodukt* II vom Schmelzp. 101—102° umgewandelt wird. Läßt man aber Chlor im *Sonnenlicht* längere Zeit auf das Keton F in Tetrachlorkohlenstoff einwirken, so geht die Reaktion weiter, indem sich noch ein zweites Molekül Chlor anlagert. Allerdings konnte das so entstandene *Tetrachlorid* aus dem öligen Reaktionsgemisch nicht isoliert werden, aber sein Umwandlungsprodukt, das *zweifach im Kern gechlorte* Keton III — Schmelzp. 88—89° — ließ sich ohne Mühe gewinnen.

Demnach vermag im Gegensatz zu einem *ortho*-Substituenten ein solcher in *meta*-Stellung zur Ketogruppe die Anlagerung von Chlor *nicht* zu verhindern. *Hemmend* wirkt allerdings auch er, denn die Aufnahme des zweiten Moleküls Chlor erfolgt bei dem Keton F wesentlich

Digitized by Google

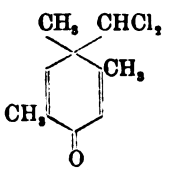
schwerer als bei dem Keton A, das keine Kernsubstituenten besitzt.

Um ganz sicher zu sein, daß dieser Unterschied zwischen *ortho-* und *meta*-Derivaten tatsächlich besteht, haben wir daraufhin nochmals das früher untersuchte Keton E mit *ortho*-ständigem Methyl und Chlor, sowie das o,o-Dichlorketon C energisch mit Chlor behandelt, fanden jedoch bestätigt, daß diese Verbindungen kein weiteres Chloratom im Kern aufzunehmen vermögen. Allerdings entstanden bei diesen Versuchen Produkte mit höherem Chlorgehalt, jedoch hatten diese öligen Substanzen nichts mit den gut krystallisierten, im Kern chlorierten Verbindungen gemein und stellten vermutlich Gemische von Körpern dar, die durch Chlorierung in den Seitenketten entstanden waren. Auch bei der Darstellung der normalen Anlagerungsprodukte treten nicht selten derartige ölige Stoffe als Verunreinigungen auf.

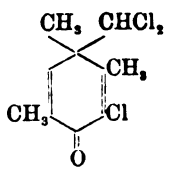
Daß in der Verbindung III die beiden Chloratome sich tätsächlich in Nachbarstellung zum Carbonyl befinden, ergibt sich nicht nur aus Analogien, sondern auch aus der Unfähigkeit dieses Ketons, mit p-Nitrophenylhydrazin zu reagieren. Der Körper II liefert dagegen ein p-Nitrophenylhydrazon, das bei 206—208° schmilzt.

Eine weitere Bestätigung der aufgestellten Regel brachte die Untersuchung des aus dem Pseudocumenol erhältlichen Ketons G, das selbst unter den denkbar günstigsten Bedingungen nur *ein* Molekül Chlor aufnahm. Auch hier konnte das ursprüngliche Anlagerungsprodukt nicht gefaßt werden, sondern nur das beständigere Keton IV, das aus jenem durch Abspaltung von Chlorwasserstoff entstanden war. Der Körper schmilzt bei 142—143° und ist indifferent gegen p-Nitrophenylhydrazin.

G



IV



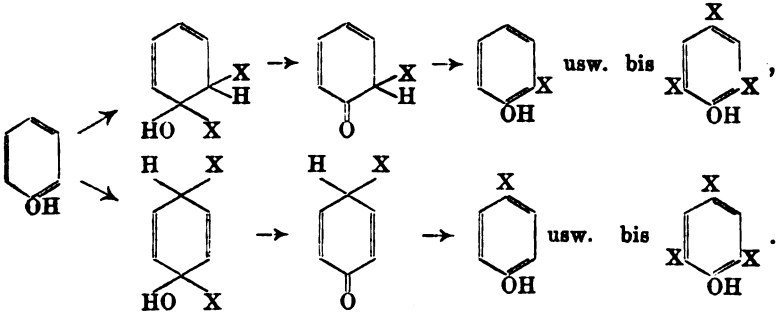
Digitized by Google

Wenn vorstehend und früher immer davon gesprochen worden ist, daß Substituenten in *ortho*-Stellung zum Carbonyl die Anlagerung von Chlor verhindern, so ist dies vielleicht nicht ganz zutreffend. Es wäre denkbar, daß sich auch aus derartigen Verbindungen zunächst Additionsprodukte bilden, die aber leicht wieder zerfallen, da sie zur Abspaltung von Chlorwasserstoff unter Bildung von *meta*-Chlorsubstitutionsprodukten nicht fähig sind. In der Tat erscheint die Annahme, daß die Anlagerung von Chlor durch ein zur Ketogruppe *ortho*-ständiges Methyl oder Chlor etwa sterisch gehindert werden könne, wenig verständlich, da man dies eher erwarten sollte, wenn das Chlor an ein Kohlenstoffatom treten soll, das, wie in den Ketonen F und G, bereits ein Methyl trägt und sich in Nachbarschaft zur stark raumerfüllenden Gruppe $>C<^{CHCl_2}_{CH_3}$ befindet.

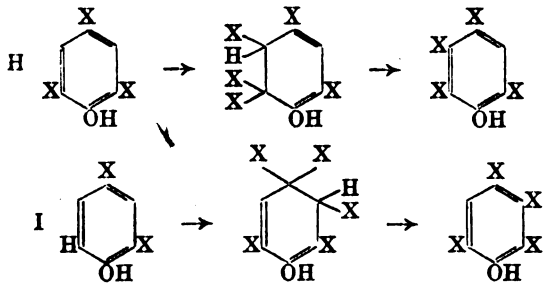
Dagegen stimmt das Ausbleiben der Bildung von *meta*-Derivaten dieser Ketone gut zu den bekannten Substitutionsgesetzen der Phenole, bei denen gleichfalls eine Abneigung gegen eine Halogenierung in *meta*-Stellung besteht. Allerdings verhalten sich die einzelnen Phenole in dieser Beziehung scheinbar verschieden, denn während beispielsweise die direkte Überführung des *Phenols* in ein Tetrachlor- oder Tetrabromphenol nicht möglich ist, gelingt es ohne besondere Schwierigkeit, *meta*-Halogenderivate aus gewissen Xylenolen oder aus dem Pseudocumenol unmittelbar zu gewinnen.

In Wirklichkeit liegen jedoch die Verhältnisse nach unserer Anschauung folgendermaßen: Ein unmittelbarer Ersatz von Wasserstoff durch Halogen findet bei allen diesen Reaktionen überhaupt nicht statt, vielmehr lagern sich zunächst ein oder mehrere Moleküle Halogen an die Doppelbindungen des Benzolkernes an, was nach bekannten Gesetzmäßigkeiten zur Bildung von *ortho*- und *para*-Derivaten führen muß, z. B.:

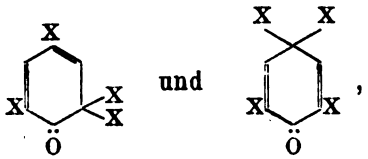
Digitized by Google



Wenn auf diese Weise alle *ortho-* und *para*-ständigen Wasserstoffatome ersetzt sind, könnten an sich die *meta*-ständigen an die Reihe kommen, wenn nunmehr die Anlagerung von Halogen usw. nach dem Schema H oder I



fortschritte. Da aber bekanntlich die Anlagerungsfähigkeit eines ungesättigten Systems durch ein endständiges Hydroxyl sehr gesteigert wird, lagern sich auch die weiteren Halogenatome in der oben skizzierten Weise an, und es entstehen die besonders von Zincke eingehend erforschten Ketochloride und -bromide

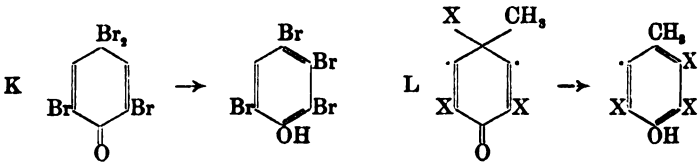


gut charakterisierte, beständige Verbindungen, die erst unter dem Einfluß umlagernder Mittel in Phenole übergehen. Das bekannteste Beispiel hierfür ist wohl die Umwandlung des Benediktschen „Tribromphenolbroms“ (K

Digitized by Google

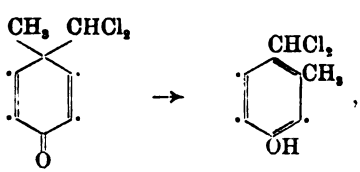
in Tetrabromphenol, die durch heiße konzentrierte Schwefelsäure bewirkt wird.[1])

Die gleiche Umlagerung, die bei diesen Ketohaloiden erst unter Zwang eintritt, erleiden anscheinend Verbindungen vom Typus L, die aus homologen Phenolen



entstehen können, freiwillig oder jedenfalls wesentlich leichter. Daher lassen sich, wie bemerkt, solche Phenole nicht selten durch überschüssiges Brom direkt perbromieren, indem sich jene Zwischenprodukte von selbst oder unter dem Einfluß des nascierenden Bromwasserstoffs umlagern. Auch die Wirkung des Aluminiumbromids bei der Bodrouxschen Bromierungsmethode beruht wohl darauf, daß es diese Atomverschiebung erleichtert.

Nach dieser Anschauung hängt die Entscheidung darüber, wie leicht in einem Phenol *meta*-ständiger Wasserstoff durch Halogen ersetzt wird, lediglich von dem Grad der Beständigkeit der zuvor entstandenen Ketoverbindung ab. Letzten Endes wird sich die Substitution auf irgendeine Weise immer erzielen lassen, da auch das beständigste hydroaromatische Ketohaloid eine gewisse Neigung haben wird, in das stabilere System eines isomeren Phenols überzugehen. Theoretisch besteht diese Möglichkeit auch bei den Cyclohexadienonen mit einer *para*-ständigen *gem.*-Gruppe, aber praktisch haben sich bisher keine Anzeichen für die Verwirklichung einer Umlagerung, etwa im Sinne der Formeln



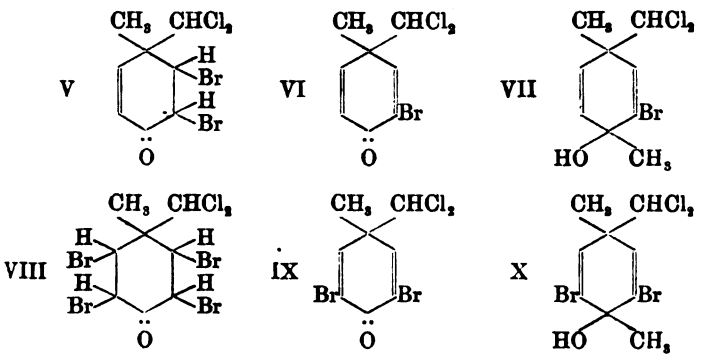
[1]) Diese Annalen **199**, 132 (1879).

Digitized by Google

ergeben. Der Weg, der bei den Phenolen zu *meta*-Halogenderivaten führt, ist somit bei diesen Ketonen verschlossen, und dies erklärt, warum auch bei energischer Einwirkung von Halogenen bisher keine derartigen Substitutionsprodukte erhalten wurden.

Bromierungsversuche wurden mit den aus *p-Kresol* und aus *as. m-Xylenol* entstehenden gechlorten Cyclohexadienonen angestellt. Die Anlagerung von Brom an diese Ketone verläuft genau in derselben Weise wie die Addition von Chlor, ebenso wandeln sich diese Körper auch in gleicher Weise um; nur sind die primären Additionsprodukte zersetzlicher als die entsprechenden Chlorderivate.

Läßt man ein Molekül Brom auf das Keton A einwirken, so entsteht das sehr unbeständige Dibromid V



vom Schmelzp. 80—81°. Schon nach einem Tage pflegen die derben Nadeln des Körpers unter Entwicklung von Bromwasserstoff gänzlich zerflossen zu sein. Glatt tritt diese Zersetzung beim Kochen mit Kaliumacetat in Eisessig ein; dabei entsteht das *Monobromketon* VI, das bei 89—90° schmilzt und unter 12 mm Druck bei 183—185° unzersetzt destilliert. Sein *p-Nitrophenylhydrazon* ist ein ziegelrotes Pulver vom Schmelzp. 154—156°.

Mit Magnesiumjodmethyl erhält man aus dem gebromten Keton den *tertiären Alkohol* VII, der bei 103° bis 104° schmilzt und ähnlich beständig wie sein chlor-

Digitized by Google

haltiges Analogon ist, denn erst bei 150—160° spaltet er Wasser ab und verändert sich dann weiter. Dauernd haltbar ist jedoch dieses Carbinol ebensowenig wie fast alle Körper dieser Art, denn im Laufe von etwa zwei Monaten zersetzt es sich beim Aufbewahren völlig.

Bei der Anlagerung von 2 Molekülen Brom an das Ausgangsketon entstehen, wie bei dem entsprechenden Chlorierungsprozeß, zwei *Tetrabromide* (VIII) nebeneinander, die sich durch Schmelzpunkt, Löslichkeit und Beständigkeit voneinander unterscheiden. Wie bei ähnlichen Verbindungen wird man das tiefer — bei 118—119° — schmelzende und leichter zersetzliche Isomere als die *cis-trans*-Form ansehen, das höher — bei 137° — schmelzende, beständigere aber als die *cis*-Modifikation.

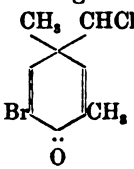
Beide Körper liefern beim Kochen mit Eisessig und Kaliumacetat dasselbe *Dibromketon* IX vom Schmelzpunkt 120—121°. Weiteres Brom vermag diese Substanz auch bei höherer Temperatur nicht aufzunehmen.

Daß beide Bromatome sich in *ortho*-Stellung zum Carbonyl befinden, folgt aus der Unfähigkeit des Körpers, mit p-Nitrophenylhydrazin zu reagieren. Damit ergibt sich auch die gleiche Stellung für das Brom im einfach gebromten Keton, da dieses bei weiterer Bromierung in das Bisubstitutionsprodukt übergeht. Um die Konstitution des Dibromderivates noch sicherer zu beweisen, versuchte man es zum *o,o-Dibrom-p-kresol* zu reduzieren, jedoch verlief der Versuch nicht glatt, und das erwartete Reduktionsprodukt ließ sich nicht bestimmt nachweisen. Man schlug daher den umgekehrten Weg ein und führte jenes Dibromkresol durch Behandlung mit Chloroform und Alkali in das Keton IX über. Die Umsetzung ging allerdings sehr langsam vor sich und lieferte nur eine geringe Ausbeute, aber das entstandene hydroaromatische Keton konnte doch mit aller Sicherheit identifiziert werden.

Magnesiumjodmethyl führt das Keton in das *Carbinol* X über, das bei 91—92° schmilzt. Diese Substanz

Digitized by Google

zersetzt sich erst bei 250°; die früher bei den Chlorderivaten gemachte Beobachtung, daß kernständiges Halogen die Haltbarkeit dieser Alkohole in bemerkenswerter Weise steigert, findet sich also bei diesen Bromverbindungen in vollem Maße bestätigt.

Das Anlagerungsprodukt von Brom an das Keton aus *as.* m-Xylenol ist noch unbeständiger als das Kresolderivat; es begann sich bereits während seiner Darstellung zu zersetzen und konnte daher nicht in reinem Zustand erhalten werden. Dagegen ließ sich aus dem Reaktionsgemisch durch Einwirkung von Kaliumacetat leicht das *Monobromketon* XI  gewinnen. Es schmilzt bei 65—66° und siedet unter 13 mm Druck unzersetzt bei 180—185°. Mit p-Nitrophenylhydrazin setzt es sich nicht um, was mit der angenommenen Struktur in Einklang ist. Ebenso reagiert es nicht weiter mit Brom, auch wenn man dieses im Überschuß unter kräftiger Bestrahlung durch Sonnenlicht längere Zeit auf das Keton einwirken läßt.

Experimenteller Teil.

1,2-Dimethyl-1-dichlormethyl-5,6-dichlorcyclohexen-(2)-on-(4) (I).

Während die aus p-Kresol und *as.* m-Xylenol erhältlichen gechlorten Cyclohexadienone in trocknem Zustand in einer Atmosphäre von Chlor dieses Halogen rasch aufnehmen, bleibt das entsprechende Derivat des *as. o-Xylenols* unter den gleichen Bedingungen völlig unangegriffen. Dagegen findet die Anlagerung statt, wenn man durch eine Lösung des Ketons in Schwefelkohlenstoff 3 Stunden einen langsamen Strom von Chlor durchleitet. Nach dem Abblasen des Lösungsmittels bl[illegible]

Digitized by Google

das entstandene *Dichlorid* in kleinen, derben, farblosen Krystallen zurück, die man durch Verreiben mit Petroläther von geringen öligen Beimengungen befreit und dann aus Methylalkohol umkrystallisiert.

Der Körper ist leicht löslich in Alkohol, Äther, Benzol, Aceton und Chloroform, schwieriger in kaltem Methylalkohol und Petroläther. Er schmilzt unter Aufschäumen bei 82—83° und zersetzt sich auch beim Aufbewahren allmählich. Daher wurde bei einer Analyse, die mit einem schon einige Zeit aufbewahrten Präparat ausgeführt wurde, etwas zu wenig Chlor gefunden.

0,1082 g verbrauchten 15,4 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_9H_{10}OCl_4$	Gef.
Cl	51,4	50,4

1,2-Dimethyl-1-dichlormethyl-5-chlorcyclohexadien-(2,5)-on-(4) (II).

Dieser Körper entsteht, wenn das eben beschriebene Dichlorid kurze Zeit mit Kaliumacetat in Eisessig gekocht wird. Beim Eingießen in Wasser scheidet sich das Reaktionsprodukt zunächst ölig aus, erstarrt aber bald und wird nach dem Trocknen am besten aus Leichtbenzin umkrystallisiert. Auch Schwefelkohlenstoff kann man dazu benutzen; in den anderen gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln ist die Substanz zu leicht löslich.

Die Verbindung bildet kleine, derbe, farblose Prismen vom Schmelzp. 101—102°.

0,0882 g verbrauchten 11,0 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_9H_8OCl_3$	Gef.
Cl	44,4	44,2

Das *p-Nitrophenylhydrazon* des Körpers scheidet sich als fein-krystallinischer gelber Niederschlag aus, wenn man eine wäßrig-alkoholische Lösung des Ketons mit salzsaurem p-Nitrophenylhydrazin versetzt und über Nacht stehen läßt. Es ist in den meisten Mitteln *bino*[illegible]er löslich, leicht in Aceton und Essigester. Das

Digitized by Google

beste Krystallisationsmittel ist Eisessig. Schmelzp. 206 bis 208°.

0,0502 g verbrauchten 4,1 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{15}H_{14}O_2N_2Cl_2$	Gef.
N	28,4	29,0

1,2-Dimethyl-1-dichlormethyl-3,5-dichlorcyclohexadien-(2,5)-on-(4) (III).

3 g des Ausgangsketons löste man in etwa 25 ccm Tetrachlorkohlenstoff und sättigte die Lösung bei — 20° mit Chlor. Das Gefäß — ein starkwandiges Präparatenglas mit eingeschliffenem Stopfen — wurde dann fest verschlossen und 2 Tage lang dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt. Beim Öffnen entwich neben etwas Chlorwasserstoff viel unverbrauchtes Chlor. Beim Verdunsten des Tetrachlorkohlenstoffs blieb eine farblose ölige Masse zurück, aus der sich auf keine Weise etwas Festes erhalten ließ. Man kochte daher das Produkt $^1/_2$ Stunde mit Eisessig und Kaliumacetat und goß dann in Wasser. Die ausgeschiedene bräunliche Schmiere trocknete man in Äther über Chlorcalcium, verjagte den Äther und brachte das hinterbliebene Öl durch Kratzen zum Erstarren. Man kochte die Masse mehrfach mit Petroläther aus, wobei die Hauptmenge der Verunreinigungen ungelöst blieb, verrieb das durch Eindampfen der Auszüge gewonnene gelbliche Produkt mit ganz wenig eiskaltem Methylalkohol, bis es vollkommen weiß geworden war und krystallisierte es schließlich aus heißem Methylalkohol um.

Derbe, farblose, stark glänzende Krystalle, die bei 87° erweichen und bei 90° klar geschmolzen sind. Leicht löslich in den meisten organischen Mitteln.

0,0549 g verbrauchten 8,05 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_9H_8OCl_4$	Gef.
Cl	51,8	52,0

Auch bei dreitägigem Kochen mit p-Nitrophenylhydrazinchlorhydrat in wäßrig-alkoholischer Lösung bildete das Keton kein Hydrazon.

Digitized by Google

1,3,6-Trimethyl-1-dichlormethyl-5-chlorcyclohexadien-(2,5)-on-(4) (IV).

Auf 4 g des gechlorten Ketons aus Pseudocumenol ließ man Chlor unter den gleichen Bedingungen einwirken, wie beim vorigen Versuch. Auch hier konnte das primäre Additionsprodukt nicht in reiner Form isoliert werden. Behandlung mit Kaliumacetat lieferte ein öliges Produkt, das nach dem Trocknen in ätherischer Lösung im Vakuum rektifiziert wurde. Unter 12 mm Druck ging bei 208—212° ein klares, dickes, gelbliches Öl über, das beim Kratzen und Verreiben mit Methylalkohol bald fest wurde.

Perlmutterglänzende, farblose Blättchen vom Schmelzpunkt 142—143° aus Methylalkohol. Leicht löslich in Alkohol, Äther und Aceton.

0,0463 g verbrauchten 5,5 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

	Ber. für $C_{10}H_{11}OCl_3$	Gef.
Cl	42,0	42,1

Auch dieses Keton reagierte trotz mehrtägigen Kochens nicht mit p-Nitrophenylhydrazin.

1-Methyl-1-dichlormethyl-2,3-dibromcyclohexen-(5)-on-(4) (V.

Versuche, den Körper analog der Darstellung des entsprechenden Dichlorids durch Liegenlassen in einer Atmosphäre von Bromdampf zu gewinnen, verliefen nicht günstig, wahrscheinlich weil die Anlagerung zu langsam vor sich geht und das entstandene Dibromid sich während dessen bereits zum Teil wieder zersetzt. Glatt erfolgt dagegen die Bildung des Körpers, wenn man äquimolekulare Mengen der Komponenten in Schwefelkohlenstoff unter Kühlung zusammengibt und das Lösungsmittel sofort abdunstet. Den beim Kratzen krystallinisch erstarrenden Rückstand verreibt man mit etwas Methylalkohol oder Petroläther und krystallisiert ihn aus dem ersten Mittel um.

Der Körper bildet derbe, farblose Nadeln, die in frischem Zustand bei 80—81° schmelzen. Schon nach

Digitized by Google

1—2 Stunden pflegt aber der Schmelzpunkt gesunken zu sein, und nach 24 Stunden ist die Substanz völlig zerflossen. Daher zersetzt sich die Verbindung auch, wenn man sie aus höher siedenden Mitteln umzukrystallisieren versucht. In Schwefelkohlenstoff und Tetrachlorkohlenstoff ist sie sehr leicht löslich.

0,2608 g verbrauchten 29,75 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$; statt ber. für $C_8H_8OCl_2Br_2$ 29,6 ccm.[1])

1-Methyl-1-dichlormethyl-3-bromcyclohexadien-(2,5)-on-(4) (VI).

Zur Reinigung dieses Körpers wurde das rohe Dibromid, wie es nach dem Abblasen des Lösungsmittels in halbfestem Zustand erhalten wurde, $^1/_2$ Stunde mit Kaliumacetat und Eisessig gekocht. Das beim Eingießen in Wasser ausgeschiedene Öl erstarrte im Laufe einiger Tage. Da dieses Rohprodukt sich nur schwierig umkrystallisieren ließ, destillierte man es im Vakuum. Unter 15 mm Druck ging bei 183—185° ein dickes, helles klares Öl über, das bald erstarrte. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 70 % d. Th.

Aus Leichtbenzin scheidet sich der Körper in großen, derben, farblosen, verwachsenen Krystallen ab, die bei 89—90° schmelzen. In Methyl- und Äthylalkohol, Äther und Aceton ist er leicht löslich.

---

[1]) Alle Halogenbestimmungen dieser chlor- und bromhaltigen Körper wurden nach der Methode von Baubigny und Chavanne ausgeführt. Dabei begnügte man sich meistens damit, die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter Silbernitratlösung mit der für die angewandte Menge des Chlorbromderivates theoretisch berechneten zu vergleichen. Jedoch wurden in einem Fall zur Kontrolle die Halogene nach der Methode von Friedheim und R. J. Meyer (Zeitschr. f. anorg. Chem. 1, 407 [1892]) gesondert bestimmt.

Dabei wurde folgendermaßen verfahren: Nach der Zersetzung der Substanz wurde die Absorptionsflüssigkeit auf 200 ccm aufgefüllt, und in 100 ccm die Anzahl von Kubikzentimetern Silberlösung bestimmt, die zur Fällung des Gesamthalogens erforderlich war. Die andere Hälfte destillierte man nach Friedheim und titrierte im Destillat das Brom. Aus der Differenz beider Bestimmungen ergab sich der Wert für Chlor.

Digitized by Google

0,2052 g verbrauchten für Cl + Br 22,7 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$
0,2052 g „ „ Br 7,6 ccm „

Differenz für Cl 15,1 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$

	Ber. für $C_8H_7OCl_2Br$	Gef.
Cl	26,3	26,1
Br	29,6	29,6

Das *p-Nitrophenylhydrazon* der Substanz bildete sich bei $1^1/_2$ tägigem Kochen des Ketons mit salzsaurem p-Nitrophenylhydrazin in verdünntem Alkohol.

Ziegelrotes Pulver vom Schmelzp. 154—156°. Leicht löslich in Methyl- und Äthylalkohol sowie in Aceton, schwer in Benzin. Aus Benzol konnte die Verbindung in schönen, glänzenden, braunen Blättchen gewonnen werden, die anscheinend Krystallbenzol enthielten und auf dem Wasserbad verschmierten.

0,0908 g verbrauchten 6,8 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$; statt ber. für $C_{14}H_{12}O_5N_3Cl_2Br$ 6,72 ccm.

1,4-Dimethyl-1-dichlormethyl-3-bromcyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (VII).

Zu einer Lösung von 0,9 g Magnesium und 5,5 g Jodmethyl in 20 ccm abs. Äther ließ man 5 g des eben besprochenen Ketons in 70 ccm Äther in der Hitze zutropfen und kochte dann noch etwa $^1/_2$ Stunde. Darauf wurde die ätherische Lösung mit eiskalter Salmiaklösung durchgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und dann eingedampft. Der ölige Rückstand erstarrte erst nach längerem Stehen. Man verrieb das Produkt mit Leichtbenzin und krystallisierte es dann aus dem gleichen Mittel um. Der Schmelzpunkt wurde sofort bei 103° bis 104° konstant.

Der Körper bildet feine, weiche, rosettenförmig verwachsene Nadeln und ist leicht löslich in Alkohol, Äther und Aceton, schwer in Petroläther. Er ist nicht ganz so beständig wie sein chlorhaltiges Gegenstück, denn er läßt sich nicht unzersetzt destillieren, spaltet aber

Digitized by Google

erst bei 150° Wasser ab und geht dabei unter Aufsieden in eine aromatische Verbindung über. Bei längerem Aufbewahren verwandelt er sich in eine harzige Masse.

0,1400 g verbrauchten 14,7 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$; statt ber. für $C_9H_{11}OCl_2Br$ 14,7 ccm.

1-Methyl-1-dichlormethyl-2,3,5,6-tetrabromcyclohexanon-(4) (VIII).

Läßt man zwei Moleküle Brom auf ein Molekül des Ausgangsketons in Tetrachlorkohlenstoff oder Schwefelkohlenstoff einwirken, so entstehen regelmäßig Gemische zweier stereoisomerer *Tetrabromide*, in denen die *cis-trans*-Form überwiegt. Die Trennung der Isomeren gelingt leichter, wenn man in Schwefelkohlenstoff arbeitet, daher ist das folgende Verfahren zu empfehlen.

Zu der Lösung von 1 Molgew. Keton in etwa dem 5fachen Gewicht Schwefelkohlenstoff läßt man unter Eiskühlung allmählich 2 Molgew. Brom im selben Mittel zutropfen. Die erste Hälfte des Broms wird rasch verschluckt, die zweite langsamer. Beim Stehen des Gemisches scheidet sich die *cis-trans-Verbindung* in feinen, weißen Nadeln so reichlich aus, daß das Ganze zu einem Brei erstarrt. Man saugt ab und krystallisiert den Niederschlag einmal aus Schwefelkohlenstoff um. In höher siedenden Mitteln zersetzt sich die Substanz zu leicht.

Der Körper schmilzt unmittelbar nach dem Umkrystallisieren bei 118—119° unter Zersetzung; schon nach kurzer Zeit sinkt aber der Schmelzpunkt; nach einigen Stunden ist die Substanz weich und nach 1 bis 2 Tagen gänzlich zerflossen.

0,2670 g verbrauchten 31,3 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$; statt ber. für $C_9H_8OCl_2Br_4$ 31,4 ccm.

Zur Gewinnung der *cis-Form* dunstet man das ursprüngliche Filtrat ein, nimmt den Rückstand in Methylalkohol auf und läßt die Lösung freiwillig verdunsten.

Digitized by Google

Dabei scheidet sich die Substanz allmählich ab; zu v ölligen Reinigung krystallisiert man sie zweckmäßig aus Leichtbenzin um.

Die Verbindung bildet feine, weiße, rosettenförmig a ngeordnete Nadeln und schmilzt bei 137° unter Zerse tzung. In Methylalkohol ist sie leicht löslich, in Leichtb enzin nur mäßig. Sie läßt sich lange Zeit aufbewahren, ohne sich zu verändern.

0,1718 g verbrauchten 20,0 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$; statt ber. für $C_8H_8OCl_2Br_4$ 20,1 ccm.

1-Methyl-1-dichlormethyl-3,5-dibrom-cyclohexadien-(2,5)-on-(4) (IX).

Man erhält diesen Körper rasch und bequem, wenn man 2 Molgew. Brom an das zweifach gechlorte Keton in Schwefelkohlenstoff anlagert, das Lösungsmittel am Gebläse verdampft und den teigigen Rückstand $^1/_2$ Stunde mit Kaliumacetat und Eisessig kocht. Das Reaktionsprodukt wird nach dem Eingießen des Gemisches in Wasser bald fest und läßt sich aus Benzin (Siedep. 70° bis 80°) umkrystallisieren.

Kleinere Mengen der Verbindung wurden auch aus reinen Präparaten der beiden isomeren Tetrabromide dargestellt.

Der Körper ist leicht löslich in Alkohol und Benzol, schwerer in Methylalkohol und Leichtbenzin. Aus diesem Mittel scheidet er sich bei rascher Krystallisation in derben, farblosen Nadeln oder dünnen Prismen aus; bei langsamem Verdunsten der Mutterlaugen kann man ihn in großen Tafeln gewinnen. Sein Schmelzpunkt liegt bei 120—121°.

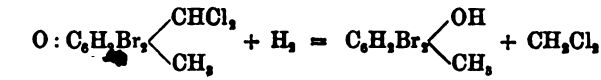
0,2145 g verbrauchten 24,6 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$; statt ber. für $C_8H_6OCl_2Br_2$ 24,6 ccm.

Natürlich kann man dieses *Dibromketon* auch aus m Monobromderivat durch entsprechende Behandlung it Brom gewinnen.

Digitized by Google

Als das Dibromketon längere Zeit mit überschüssigem Brom im Rohr auf 100° erhitzt wurde, blieb es unverändert.

Um nach der Gleichung



das zweifach gebromte Keton zum *o,o-Dibrom-p-kresol* zu reduzieren und damit seine Struktur zu beweisen beweisen, behandelte man die Verbindung in Eisessig bei Zimmertemperatur oder bei 50—60° oder in der Siedehitze so lange mit Zinkstaub, bis eine Probe des Reaktionsprodukts sich klar oder fast klar in Lauge auflöste. Dann goß man in Wasser, nahm das Produkt in Äther auf, wusch mit Sodalösung, entzog das gebildete Phenol dem Äther durch Natronlauge und setzte es endlich mit Säure in Freiheit. Die so gewonnenen Präparate waren ölig und erstarrten zwar bei niedriger Temperatur zu einem dicken Sirup, wenn man sie mit Dibrom-p-kresol impfte, doch ließ sich dieses Phenol nicht in reiner Form aus diesen Produkten isolieren. Vermutlich war bei den Reduktionsversuchen schon ein Teil des Broms aus dem Kern herausgenommen worden.

Es wurde daher nunmehr umgekehrt das o,o-Dibrom-p-kresol durch Behandlung mit *Chloroform und Natronlauge* in das zweifach gebromte Keton verwandelt.

Das Dibromkresol wurde nach der Vorschrift von Claus und Jackson[1]) dargestellt und durch Destillation im Vakuum — Siedep.$_{11}$: 139—140° — gereinigt. Die Substanz siedet übrigens in reinem Zustand auch unter gewöhnlichem Druck ohne Zersetzung.

40 g des Phenols löste man in 90 ccm 30 prozentiger Natronlauge und 220 ccm Wasser, erhitzte im Wasserbad auf 80—100° und ließ im Laufe einiger Stunden

[1]) Journ. prakt. Chem. [2] 38, 326 (1888).

Digitized by Google

28 ccm Chloroform zutropfen. Da die Umsetzung sehr langsam von statten ging, gab man von Zeit zu Zeit kleine Mengen von Chloroform nach, sobald das Gemisch nicht mehr lebhaft siedete, und hielt die Reaktion ungefähr 14 Stunden im Gang. Darauf trennte man die Chloroformschicht von der Lauge, destillierte das Chloroform ab und verrieb den Rückstand mit Natronlauge. Da der Rückstand schmierig blieb, nahm man ihn in Äther auf, schüttelte die Lösung mehrfach mit Lauge durch und verdampfte den Äther. Es hinterblieb ein dickes Harz, das mit Schwerbenzin unter Zusatz von Tierkohle ausgekocht wurde. Über Nacht schieden sich neben öligen Schmieren derbe, farblose Krystalle aus dem Auszug aus, die bei 117° schmolzen und sich als das gewünschte *Dibromketon* erwiesen. Die Ausbeute war sehr gering, denn es wurden nur 2—3 g krystallisiertes Rohprodukt, und daraus etwa 0,5 g reines Keton gewonnen.

1,4-Dimethyl-1-dichlormethyl-3,5-dibromcyclohexadien-(2,5)-ol-(4) (X).

Man ließ 5 g zweifach gebromtes Keton in 70 ccm abs. Äther in eine siedende ätherische Lösung von Grignardschem Reagens aus 1,7 g Magnesium und 4 g Jodmethyl tropfen. Nachdem das Gemisch noch 1 Stunde gekocht hatte, fügte man eiskalte Salmiaklösung hinzu und arbeitete das Reaktionsgemisch in bekannter Weise auf. Man erhielt ein dickes Öl, das rasch erstarrte, und reinigte den Körper durch Verreiben mit Leichtbenzin und Umkrystallisieren aus demselben Mittel.

Der *tertiäre Alkohol* krystallisiert in feinen, weißen, rosettenförmig verwachsenen Nadeln und schmilzt bei 91—92°. Er läßt sich monatelang unverändert aufbewahren und spaltet erst bei 250° Wasser ab.

0,1020 g verbrauchten 11,0 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$; statt ber. für $C_9H_{10}OCl_2Br_2$ 11,2 ccm.

Digitized by Google

1,3-Dimethyl-1-dichlormethyl-5-bromcyclohexadien-(2,5)-on-(4) (XI).

Das chlorierte Keton aus *as.* m-Xylenol lagert nur langsam Brom an, und da das Additionsprodukt wenig beständig ist, beginnt seine Zersetzung schon vor dem Ende der Reaktion. Es wurde daher gleich auf das durch Abspaltung von Bromwasserstoff entstehende *Monobromderivat* hingearbeitet.

Man gab zur Lösung des Ausgangsmaterials in Schwefelkohlenstoff die $2^1/_2$ fach molekulare Menge Brom und ließ das Gemisch erst über Nacht und dann noch einige Stunden im Sonnenlicht stehen. Der nach dem Abblasen des Lösungsmittels verbliebene dicke, ölige Rückstand wurde mit Eisessig und Kaliumacetat gekocht. Das in Wasser gegossene, anfangs ölige Reaktionsprodukt erstarrte rasch, wurde in Äther getrocknet und dann im Vakuum destilliert. Unter 13 mm Druck ging bei 180—185° ein dickes, gelbes Öl über, das sich beim Impfen und Kratzen in eine gelblich-weiße Krystallmasse verwandelte. Die Ausbeute betrug 60 Proz. d. Th.

In den gebräuchlichen organischen Mitteln ist der Körper leicht löslich, mit Ausnahme von Petroläther, aus dem er sich gut umkrystallisieren läßt. Die derben, farblosen Krystalle schmelzen bei 65—66°.

0,1539 g verbrauchten 16,3 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$; statt ber. für $C_9H_9OCl_2Br$ 16,2 ccm.

Mit *p-Nitrophenylhydrazin* reagierte die Substanz auch bei mehrtägigem Kochen in alkoholischer Lösung nicht.

Digitized by Google

Über natürliche und künstliche Pfefferstoffe und die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Pfeffergeschmack;

von *Erwin Ott* und *Kurt Zimmermann*.[1])

[Erste Mitteilung.]

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Münster i. W.]

(Eingelaufen am 11. März 1921.)

Theoretischer Teil.

Der schwarze Pfeffer (piper nigrum L.) gehört in seiner ursprünglichen Heimat Indien zusammen mit dem Salz zu den ältesten Gewürzen, die verwendet worden sind. In gleicher Weise wie der schwarze Pfeffer haben sich schon im klassischen Altertum auch der weiße und der lange Pfeffer von Indien aus allmählich nach den Mittelmeerländern Eingang verschafft. Der weiße Pfeffer stammt von der gleichen Pflanze wie der schwarze; die festhaftende, äußere schwarze Schicht der noch nicht ausgereiften Pfefferkörner läßt sich bei den völlig ausgereiften Körnern leicht abreiben und abwaschen.

Der spanische Pfeffer (Cayennepfeffer) dagegen, die ausgereiften Schoten von capsicum annuum L. und capsicum fastigiatum, war im Altertum unbekannt, da er nur in Amerika heimisch war, von wo er durch die Fahrten des Columbus nach Spanien und dem übrigen Europa gelangte.

Unsere Kenntnis von der Chemie der Pfefferarten beginnt mit dem Jahre 1816, in dem Bucholz[2]) und bald darauf (1817) Braconnot[3]) den wirksamen Bestandteil des *spanischen* Pfeffers durch Extrak-

[1]) K. Zimmermann, Dissert. Münster 1921.

[2]) Almanach oder Taschenbuch für Scheidekünster und Apotheker 37, 1—79 (Weimar 1816).

[3]) Ann. chim. phys. 6, 122 (1817).

Digitized by Google

tion in unreiner Form als braunes Öl gewannen und bereits seine Fähigkeit, mit Alkalien Salze zu bilden, beobachteten. Im Jahre 1819 isolierte Oersted[1]) das *Piperin* aus *schwarzem* Pfeffer. Seine Angaben wurden in wesentlichen Punkten von J. Pelletier[2]) richtiggestellt, der nachwies, daß das Piperin keine basischen Eigenschaften wie die Alkaloide besitzt, die ihm Oersted zugeschrieben hatte, und der auch bereits die wichtige Angabe machte, daß ganz reine Piperinkrystalle beim Zerbeißen keinen scharfen Pfeffergeschmack hervorrufen, sondern daß dieser den nicht krystallisierbaren Begleitern und Verunreinigungen des Rohpiperins, dem *Pfefferharz*, zukommt. Die Bruttoformel des *Piperins* [$C_{34}H_{38}O_6N_2$ statt $C_{17}H_{19}O_3N$] wurde von Regnault[3]) festgestellt; an der Aufklärung seiner Konstitution, bei der nach und nach die Erkennung und der Aufbau seiner Spaltungsstücke *Piperidin* und *Piperinsäure* gelingt, sind seit dem Jahre 1857 eine ganze Anzahl von Forschern tätig[4]), mit der Totalsynthese des Piperins durch Ladenburg und Scholtz[5]) findet dieser Abschnitt aus der Chemie des schwarzen Pfeffers seinen Abschluß.

Das *Piperin*, das bis zu 10 Proz. im schwarzen, weißen und langen Pfeffer vorkommt[6]), ist aber, wie schon Pelletier als erster erkannte, nicht der eigentliche wirksame Bestandteil, die *Konstitution* des als *Pfeffer-*

---

[1]) Schweiggers Journ. f. Chemie und Phys. **29**, 80 (1820). Erste Untersuchung über den schwarzen Pfeffer: Willert, Trommsdorfs Journ. d. Pharmazie **20**, 44 (1811).

[2]) Ann. chim. phys. **16**, 337 (1821).

[3]) Ann. chim. phys. **68**, 159 (1838).

[4]) v. Babo u. Keller, Jahresber. über d. Fortschr. d. Chemie **1857**, 513; Strecker, diese Annalen **105**, 318 (1858); **118**, 280 (1860); Fittig u. Mielck, diese Annalen **152**, 28 (1869); **172**, 134 (1874); Doebner, Ber. d. d. chem. Ges. **23**, 2375 (1890).

[5]) Ber. d. d. chem. Ges. **15**, 1390 (1882); **27**, 2958 (1894); **28**, 1195 (1895).

[6]) Johnstone, Pharmazeut. Zeitg. **34**, 397 (1889); Pharmazeut. Zentralhalle **1889**, 358.

Digitized by Google

harz bezeichneten eigentlichen Trägers des scharfen Geschmacks dieser Pfefferarten ist vielmehr bis heute unbekannt geblieben. Beim Zerbeißen eines großen Krystalls von gut gereinigtem Piperin ist ein äußerst schwacher Pfeffergeschmack gerade eben wahrnehmbar, und die Tatsache, daß alkoholische Piperinlösungen schärferen und länger andauernden Pfeffergeschmack hervorrufen, vermag den gewaltigen Unterschied zwischen dem Zerbeißen eines Pfefferkorns und eines Piperinkrystalls von gleicher Größe nicht zu erklären, selbst wenn man annimmt, daß ein Teil des Piperins in den ätherischen Ölen des Samenkorns gelöst ist, womit Th. Weigle[1]) dem Piperin allein die Rolle des wirksamen Bestandteils der indischen Pfefferarten zuzuschreiben versucht. R. Buchheim[2]) dagegen schloß sich der schon von Pelletier geäußerten Meinung an und versuchte die Konstitution des äußerst scharfen öligen Begleiters des Piperins im schwarzen Pfeffer aufzuklären. Die Trennung konnte er (vermutlich aber nicht vollständig) durch Behandlung mit Äther bewirken, durch Kochen des aus der ätherischen Lösung erhaltenen braunen Öls, das er *Chavicin* nennt, mit alkoholischem Kali erhielt er *Piperidin* als Base und eine nicht krystallisierende Säure, *Chavicinsäure*, deren Konstitution er nicht weiter aufzuklären versuchte. Seine Untersuchung läßt also keine näheren Schlüsse auf die chemische Natur des eigentlichen Trägers des scharfen Pfeffergeschmacks in den indischen Pfefferarten zu und bedarf noch der weiteren Bearbeitung.

Wichtiger für die Erkenntnis des wirksamen Prinzips der Pfefferarten mußte naturgemäß die Untersuchung des viel schärferen *spanischen* Pfeffers werden, in dem *Piperin* überhaupt nicht vorzukommen scheint. Auch hier sind nach den bereits genannten beiden ersten Bearbeitern Bucholz und Braconnot noch eine ganze

[1]) Ber. d. Pharmazeut. Gesellsch. **3**, 210, 212 (1893); ebenso Johnstone, Pharmazeut. Ztg. **34**, 4, 235 (1889).

[2]) Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **5**, 455 (1876).

Digitized by Google

Anzahl von Forschern an der chemischen Untersuchung tätig gewesen. Erfolgreicher als Buchheim[1]), dessen *Capsicol* aus *spanischem* Pfeffer nur eine Lösung des wirksamen Bestandteils in den ätherischen Pfefferölen darstellt, war Thresh[2]), der die *Phenolnatur* des wirksamen Prinzips zur Isolierung und Reinigung ausnutzt, indem er Extrakten der Pfefferschoten mit organischen Lösungsmitteln, die mit Wasser nicht mischbar sind, durch Kalilauge den scharfschmeckenden Bestandteil entzieht und ihn dann aus den alkalischen Lösungen durch Einleiten von Kohlendioxyd wieder abscheidet.[3]) Auf diese Weise erhielt Thresh 1876 zum ersten Male den Träger des scharfen Pfeffergeschmacks der Capsicumarten in krystallinischem Zustand und fast chemisch rein (Schmelzp. 62° statt 65°). Eine von Buri im Laboratorium von F. A. Flückiger ausgeführte Analyse[4]) ergab die Formel $C_9H_{14}O_2$, übersieht also die 4,58 Proz. Stickstoff gänzlich und ersetzt sie durch Sauerstoff, ebenso zwei später von Thresh selbst ausgeführte Analysen.[5]) Die Reindarstellung des von Thresh als *Capsaicin* bezeichneten wirksamen Prinzips des spanischen Pfeffers wurde von K. Micko[6]) weiter durchgearbeitet. Dieser stellt durch Analyse und Molekulargewichtsbestimmung die unmögliche Formel $C_{18}H_{28}O_3N$ fest (seine Analysen stimmen aber ebensogut auf die richtige Formel $C_{18}H_{27}O_3N$) und beobachtet bereits Beziehungen des Capsaicins zum *Vanillin.*

Die *Konstitution des Capsaicins* wurde aber erst 1919

---

[1]) Archiv d. Heilkunde **14**, 24 (1873).

[2]) Pharmaceutical Journ. **6**, 941 (1876); **7**, 21, 259, 473 (1876); 8, 187 (1877); **15**, 208 (1884); Referat in F. A. Flückigers Pharmakognosie des Pflanzenreiches, 3. Aufl. 891 (1891).

[3]) Vgl. auch Arthur Meyer, Pharmazeut Ztg. **34**, 130 (1889).

[4]) F. A. Flückiger, Pharmakognosie des Pflanzenreichs 3. Aufl. 891 (1891).

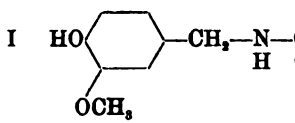
[5]) Pharmaceutical Journ. 8, 187 (1877).

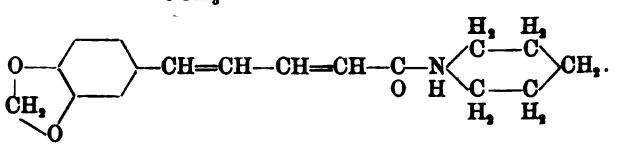
[6]) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- und Genußmittel 1, 818 (1898); 2, 411 (1899).

Digitized by Google

von E. K. Nelson[1]) ermittelt, es erweist sich als *Säureamid* des *Vanillylamins* mit einer *Decylensäure* von noch unbekanntem Bau der Kohlenstoffkette und unbekannter Lage der Doppelbindung. Diese Untersuchung gab dem erstgenannten von uns die Anregung, den Versuch zu unternehmen, *durch Synthesen die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Pfeffergeschmack festzustellen.*

Vergleicht man die von E. K. Nelson aufgestellte Formel des *Capsaicins* (*I*) mit der des *Piperins* (*II*), so ergeben sich bereits wichtige Anhaltspunkte für diese Beziehungen:





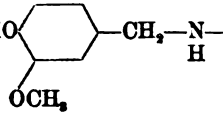
Diese werden noch deutlicher durch die Angabe Nelsons, daß der scharfe Pfeffergeschmack des Capsaicins beim Methylieren der *freien Phenol*gruppe fast völlig verschwindet. Die freie Phenolgruppe ist also bei den bisher genauer untersuchten Pfefferstoffen eine der notwendigen Vorbedingungen für das Auftreten des scharfen Pfeffergeschmacks, ob sich dieselbe im Benzolkern der Base oder der Säure des Säureamids befindet, ist voraussichtlich gleichgültig.

Da die Konstitution der *Decylensäure* des *Capsaicins* unbekannt ist, haben wir an ihrer Stelle zunächst die seit langem bekannte, durch Spaltung des Ricinusöls zugängliche *Undecylensäure* in das Vanillylamin eingeführt. Das so erhaltene Säureamid (III) besitzt in der Tat den scharfen Geschmack der Pfefferarten in der ausgeprägtesten Weise und bewirkt auch wie diese das charakteristische Kratzen im Hals. Seine physio-

[1]) Journ. Am. chem. soc. **41**, 1115 (1919) (Referat Zentralbl. **1919**, III, 783).

Digitized by Google

logischen Wirkungen stehen in nichts hinter den für das Capsaicin beschriebenen[1]) zurück.

III 

Zur Feststellung der weiteren Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Pfeffergeschmack haben wir dann beide Teile des Säureamids, Säure und Amin, variiert. An Stelle des *Vanillylamins* wurde das viel bequemer zugängliche *p-Oxybenzylamin* mit der *Undecylensäure* vereinigt. Das entstandene Amid ist im Geschmack wesentlich schwächer geworden, wodurch der auffallend starke Einfluß der Methoxygruppe erwiesen ist. Wird dann an Stelle des *p-Oxybenzylamins* die *o*-Verbindung mit der Undecylensäure vereinigt, so geht der scharfe Pfeffergeschmack weiter *sehr stark zurück.* Vereinigt man endlich *Benzylamin* mit der *Undecylensäure*, so verschwindet mit der *Phenolgruppe* auch der Pfeffergeschmack vollständig, was nach den Eigenschaften des *Methylcapsaicins* und des *Piperins* zu vermuten war. Ebenso lieferte aber auch das *p-Aminophenol* mit *Undecylensäure* ein *geschmackloses* Amid, woraus hervorgeht, daß aromatische Amine vom *Anilintypus* die den aliphatischen Aminen entsprechenden Amine vom Typus der *Oxybenzylamine* und des *Piperidins* nicht ohne Verschwinden des Pfeffergeschmacks zu ersetzen vermögen.

Der Einfluß der Konstitution der ungesättigten Säuren auf den Geschmack der aus ihnen aufgebauten Amide wurde in der Weise ermittelt, daß eine Reihe von Olefinmonocarbonsäuren von möglichst verschiedenartigem Bau in ihre *Vanillylamide* verwandelt wurden, da uns diese Base bei der Prüfung im Vergleich zu allen übrigen durch besonders scharfen Geschmack ihres Amids mit Undecylensäure aufgefallen war, und auch wegen ihres Vorkommens im Capsaicin, mit dem ihre

[1]) F. A. Flückiger, Pharmakognosie d. Pflanzenreichs 3. Aufl. 891 (1891).

Digitized by Google

Amide mit andern Olefinmonocarbonsäuren bezüglich ihres Geschmacks nun verglichen werden können. Von ungesättigten Fettsäuren haben wir bisher *Crotonsäure*, $\Delta^{\beta,\gamma}$-*Hexylensäure* (*Hydrosorbinsäure*), $\Delta^{\alpha,\beta}$-*Nonylensäure* und *Ölsäure* geprüft. Die *Crotonsäure* und *Hexylensäure* lieferten ziemlich scharf schmeckende, ölige Vanillylamide, die beiden andern Säuren aber äußerst scharf schmeckende Vanillylamide, von denen besonders das der $\Delta^{\alpha,\beta}$-*Nonylensäure* dem der $\Delta^{10,11}$-*Undecylensäure* in keiner Weise nachsteht. Es geht daraus hervor, daß der *Abstand der Doppelbindung von der Carboxylgruppe* der Fettsäure nicht von so wesentlichem Einfluß auf die Schärfe des Pfeffergeschmacks ist wie die *Stellung*, *Zahl* und *Substitution* der *Phenol*gruppen. Das *Ölsäurevanillylamid* besitzt ebenfalls äußerst scharfen Geschmack, der aber unangenehm und weniger charakteristisch pfefferartig ist wie bei den Säuren mit 9, 10 und 11 Kohlenstoffatomen. Von fettaromatischen Olefincarbonsäuren wurde endlich noch die *Zimtsäure* herangezogen, deren bei 138° schmelzendes Vanillylamid ziemlich schwachen, aber angenehm aromatischen Pfeffergeschmack besitzt. Mit der Beseitigung der Olefindoppelbindung der Fettsäuren verschwindet in der Ölsäurereihe auch der scharfe Pfeffergeschmack ***vollständig***, sofern die gesättigte Fettsäure keine Spur der ungesättigten enthält. Wir verwendeten zu diesem Nachweis eine *Stearinsäure*, die aus einem *absolut ölsäurefreien Tristearin* durch Verseifung gewonnen war. Das *Tristearin* entstammte einem in einer Ölhärtungsfabrik sehr vollständig gehärteten *Baumwollsaatöl* von der Jodzahl 0,4, und war durch etwa zwanzigmalige Krystallisation aus Benzol gereinigt worden, so daß es den Schmelzp. 73° (korr.) besaß.[1]) Das aus

[1]) Für die freundliche Überlassung von 25 g dieses schönen, ganz ölsäurefreien Tristearinpräparates und den Ratschlag, von ihm zur Gewinnung einer absolut ölsäurefreien Stearinsäure auszugehen, sind wir Herrn Prof. Dr. A. Bömer, Direktor der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Münster i. W., sehr zu Dank verpflichtet.

Digitized by Google

dieser Stearinsäure über ihr Chlorid bereitete *Vanillylamid* vom Schmelzp. 86° war nicht nur im festen Zustand, sondern auch in konzentrierter alkoholischer Lösung absolut geschmacklos. Dagegen besaß ein aus einer käuflichen „reinen" Palmitinsäure dargestellte Vanillylamid (Schmelzpunkt 79°) als Rohprodukt bereits im festen Zustand scharfen Pfeffergeschmack, der durch Umkrystallisieren aus sehr viel Äther zwar fast verschwand, aber bei alkoholischen Lösungen wieder mit sehr großer Deutlichkeit hervortrat. Man kann also durch diese Geschmacksreaktion ungesättigte Säuren als Verunreinigung in gesättigten mit einer Empfindlichkeit erkennen, die hinter den spektralanalytischen Proben auf Metalle nicht allzuweit zurückstehen dürfte. Im Hinblick auf diese Beobachtung halten wir es daher nicht für ausgeschlossen, daß auch der ebenfalls nur in alkoholischer Lösung wahrnehmbare scharfe Geschmack des *Piperins* nicht diesem, sondern den schwer bis auf die letztzen Spuren entfernbaren Resten der *Pfefferstoffe des Pfefferharzes* zukommt, und daß das *Piperin* im *absolut reinen* Zustand auch in Lösung geschmacklos ist, was wegen des Fehlens freier Phenolgruppen nach den von uns bei synthetischem *Undecylensäureanisylamid* gemachten Beobachtungen zu erwarten ist. Denn das reine Anisylamid der Undecylensäure ist im Gegensatz zum *p*-Oxybenzylamid, das schon im festen Zustand (Schmelzp. 86°) starken Pfeffergeschmack zeigt, auch in konzentrierter alkoholischer Lösung gänzlich geschmacklos.[1])

Über die *Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Pfeffergeschmack* läßt sich also bisher folgendes aussagen:

„Die bisher bekannten *Träger des scharfen Pfeffer-*

[1]) Dem entspricht, daß eine alkoholische Lösung des Anisylamids mit Eisenchlorid keinerlei Färbung liefert, während das geprüfte, ebenfalls sehr schön krystallisierte käufliche *Piperin*präparat damit eine *deutliche Dunkelgelbfärbung* (wenn auch nicht grün wie die Vanillylamide, vgl. S. 332) gab.

Digitized by Google

geschmacks sind *Säureamide* aus *ungesättigten Säuren* mit *Oxybenzylaminen*. Mit der Reduktion der Doppelbindung im Fall des Olsäurevanillylamids oder der Beseitigung oder vollständigen Substitution der freien Phenolgruppe verschwindet der scharfe Geschmack gänzlich oder geht sehr stark zurück. Die *para*-Stellung der freien Phenolgruppe zur Benzylamingruppe liefert sehr viel schärfer schmeckende Pfefferstoffe als die *ortho*-Stellung, dagegen ist die *Lage der Doppelbindung* in der Fettsäurekette nicht von so ausschlaggebendem Einfluß auf die Schärfe des Geschmacks. Der Ersatz der Oxybenzylamine durch Aminophenol lehrt, daß nur die starken *aliphatischen* bzw. *fettaromatischen Amine*, nicht aber die *schwachen aromatischen Basen* vom Typus des Anilins, die Eigenschaft besitzen, bei der Amidbildung mit Olefincarbonsäuren den Amiden scharfen Pfeffergeschmack zu verleihen.

Einen ganz erheblich verstärkenden, zugleich angenehm aromatisierenden Einfluß übt die *Methoxygruppe* des Vanillylamins auf den Pfeffergeschmack aus, von den Olefincarbonsäuren liefern die mit *mittleren* Kohlenstoffzahlen (9—11) der Kohlenstoffkette die schärfsten und zugleich aromatischen Pfefferstoffe, was auffallend an die ähnlichen Beziehungen beim Geruch der *Fettsäureester* erinnert."

Es geht daraus hervor, daß die Natur bei der Auswahl beider Komponenten des *Capsaicins* aus der sehr großen Zahl der möglichen Kombinationen mit einer überraschenden Sicherheit die schärfste und zugleich aromatischste ausgewählt hat, während beim *Piperin* offenbar die *Substitution beider* Phenolgruppen den scharfen Pfeffergeschmack zum mindesten so beeinträchtigt, daß trotz des großen Piperingehaltes der indischen Pfefferarten (bis über 10 Proz.) als eigentlicher Träger des scharfen Geschmacks das *Pfefferharz* (Gehalt höchstens bis zu etwa 1 Proz.) zu bezeichnen ist. Im Hinblick auf dieses Ergebnis wäre es von Interesse, auch etwas über den bisher nicht näher erkannten Bau

Digitized by Google

der Pfefferstoffe des Pfefferharzes im schwarzen und langen Pfeffer zu erfahren. Der eine von uns beabsichtigt auch diese Aufgabe in Angriff zu nehmen.

In einer inzwischen erschienenen Untersuchung[1]) hat E. K. Nelson im Anschluß an seine Mitteilung über die Konstitution des Capsaicins eine Anzahl von Vanillylamiden *gesättigter* Fettsäuren beschrieben und neben diesen zum Vergleich die auch in der vorstehenden Abhandlung erwähnten Vanillylamide der Crotonsäure und der Undecylensäure dargestellt.

Im Gegensatz zu den im Lauf der vorstehenden Untersuchung erkannten Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Pfeffergeschmack schreibt Nelson den Vanillylamiden der *gesättigten* Fettsäuren einen ebenso scharfen Geschmack zu wie den der ungesättigten Fettsäuren und vermutet, daß die Doppelbindung ohne Einfluß auf die Schärfe des Geschmacks sei.

Diese letztere Annahme kann durch den Vergleich des von uns beschriebenen geschmacklosen, chemisch reinen *Stearinsäurevanillylamids* mit dem äußerst scharfen *Ölsäurevanillylamid* als widerlegt betrachtet werden. Dagegen geht aus den Versuchen Nelsons hervor, daß die gesättigten Fettsäuren mit mittlerer Kohlenstoffzahl mit dem Vannillylamin scharfschmeckende Amide bilden, und zwar liegt das Maximum wie bei den Olefincarbonsäuren zwischen der *Octan-* und *Undecansäure*, indem aber vor und nach diesen beiden Grenzfällen ein viel steilerer Abfall des scharfen Geschmacks bis zu 0 nach beiden Seiten eintritt als bei den Olefincarbonsäuren, bei denen besonders nach oben hin eine ganz allmähliche Verminderung des scharfen Geschmacks stattfindet. Allerdings sind die Angaben Nelsons über den scharfen Geschmack der Vanillylamide gesättigter Fettsäuren im Hinblick auf die von uns besonders am Beispiel des *Palmitinsäurevanillylamids* studierte ganz außerordentliche

[1]) Journ. Amer. chem. soc. **41**, 2121 (1919); (Ref. Chem. Zentralbl. **1920**, I, 856).

Digitized by Google

Empfindlichkeit der Geschmacksreaktion gegen die geringste Verunreinigung durch ungesättigte in gradueller Hinsicht mit Vorsicht aufzunehmen, da sich aus seinen ausführlichen Angaben über die Gewinnung und Reinigung der verwendeten Fettsäuren ergibt, daß dieselben wahrscheinlich in mehr oder weniger erheblichem Maße durch ungesättigte verunreinigt waren. Bei der *Undecansäure*, die Nelson durch katalytische Reduktion der *Undecylen*säure darstellte, ist direkt angegeben, daß bei der Reduktion nur 96 Proz. der berechneten Wasserstoffmenge aufgenommen wurde.

Von einer Prüfung der verwendeten gesättigten Fettsäuren auf ungesättigte ist an keiner Stelle der Abhandlung die Rede, ebensowenig von der in der vorstehenden Untersuchung als so nützlich erkannten grünen Eisenchloridreaktion der Brenzkatechinabkömmlinge, die wir nur bei den Olefincarbonsäurevanillylamiden beobachteten, während sie beim chemisch reinen Stearinsäurevanillylamid absolut ausbleibt.

Im Hinblick auf die grundsätzliche Bedeutung des Einflusses der Olefindoppelbindung im Fettsäurerest auf den Pfeffergeschmack bedürfen daher diese Angaben Nelsons einer sorgfältigen Nachprüfung unter Anwendung von Vorsichtsmaßregeln, wie sie durch die vorstehend mitgeteilten Versuchsergebnisse als notwendig erkannt worden sind.

Experimenteller Teil.

Ausgangsmaterialien und Übersicht über den Gang der Synthese.

Für die Darstellung der *Oxybenzylamine* stand in den *o-* und *p-Oxyaldehyden* ein bequemes Ausgangsmaterial zur Verfügung, da diese durch die Methoden von Reimer-Tiemann und von Gattermann bequem zugänglich geworden sind. Die Erkenntnis, daß die Hydroxylgruppe in *para*-Stellung zur Benzylamingruppe sehr viel schärferen Pfeffergeschmack hervorbringt als

Digitized by Google

die *ortho*-Stellung, macht für die Synthese der sehr scharf schmeckenden Pfefferstoffe besonders die Methode von Gattermann wertvoll, da nach dieser vorzugsweise die *p*-Oxyaldehyde aus den Phenolen entstehen.

Durch Reduktion der *Oxime der Oxyaldehyde*, die nach unseren Beobachtungen am zweckmäßigsten durch siedende *alkoholische* Hydroxylaminlösungen erhalten werden, gelangten wir zu den *Oxybenzylaminen*, dem einen Baustein für die Synthesen. Diese Reduktion bereitete uns anfänglich sehr große Schwierigkeiten, da nach den bisherigen Methoden der Oximreduktion bei den Oxybenzaldoximen nur sehr geringe Ausbeuten erhalten werden können, so daß es im Hinblick auf die Kostbarkeit, vor allem des *Vanillins*, geboten erschien, eine Methode auszuarbeiten, die eine glatte Reduktion der Oxime von Oxyaldehyden ermöglicht. Nachdem an dem sehr zersetzlichen Vanillylamin beobachtet worden war, daß sich entgegen den Angaben Nelsons[1]) auch das *Chlorhydrat* der Base bereits beim Eindampfen seiner wäßrigen Lösung stark zersetzt, während die freie Base, wie schon Nelson angibt, noch viel empfindlicher schon gegen warmes Wasser und besonders gegen Alkalien ist, haben wir die bisher zur Oximreduktion gebräuchlichen Methoden gänzlich verlassen und uns der Reduktion der Oxime durch *Wasserstoff bei Gegenwart von Katalysatoren der Platingruppe* in *alkoholischer* Lösung zugewandt. Von diesen erwies sich das *Platin* als unwirksam, dagegen *Palladium* als geeignet zur Wasserstoffübertragung. Eine *kolloidale* Palladiumlösung führt auch in *neutraler* alkoholisch-wäßriger Lösung eine lebhafte Wasserstoffaufnahme herbei, das zugesetzte Schutzkolloid, Gummi arabicum, ließ sich aber von dem gebildeten Amin nicht trennen. *Gefälltes* Palladium ist in

[1]) Journ. Amer. chem. soc. **41**, 1115—1121 (1919) (Ref. Chem. Zentralbl. **1919**, III, 783). Von Nelson angewandtes Reduktionsmittel, Natriumamalgam in essigsaurer Lösung, wobei wir die von Nelson angegebene Ausbeute auch nicht annähernd erreichen konnten.

Digitized by Google

alkoholischer Suspension *unwirksam*, es tritt aber sogleich lebhafte Wasserstoffaufnahme ein, wenn die alkoholische Oximlösung mit rauchender Salzsäure *angesäuert* wird. In dieser Form erwies sich die Reduktion der Oxybenzaldoxime zu den Aminen als glatt und ohne jeden Substanzverlust durchführbar, und zwar ohne daß es erforderlich ist, dem Palladium durch Niederschlagen auf einem Träger eine besonders große Oberfläche zu geben[1]), und auch ohne einen größeren Überdruck[2]) des Wasserstoffs als den des Gasometers anzuwenden, der einer Wassersäule von etwa 75 cm entsprach. Von Interesse dabei war die Beobachtung, daß die Anwesenheit der dem entstehenden Amin *äquivalenten* Säuremenge zur vollständigen Reduktion erforderlich ist; gibt man *weniger* Säure hinzu, so hört die Reduktion auf, nachdem eine entsprechende Oximmenge reduziert worden ist, um lebhaft zu Ende zu gehen, sobald die noch fehlende Säuremenge zugefügt wird.

Für die Gewinnung der zweiten Komponente, der ungesättigten Fettsäuren, erwies sich die pyrogene Spaltung des Ricinusöls unter Anwendung des Hitzdrahtverfahrens[3]) als geeigneter Weg. Das eine Spaltungsstück,

---

[1]) Vgl. Erich Schmidt und Rudolf Wilkendorf [Ber. d. d. chem. Ges. **52**, 391 und 398 (1919)], die mit Palladium überzogenes Bariumsulfat als Katalysator für die Reduktion des *Nitrotrimethylenglykols* in *oxalsaurer* Lösung verwenden. Sehr bemerkenswert dabei ist, daß in diesem Fall in *mineralsaurer* Lösung, die bei unseren Beispielen die besten Resultate gab, *keine* Wasserstoffaufnahme eintrat, sondern *nur* in *oxalsaurer*. Gründe für die Verwendung *gefällten* Palladiums an Stelle von *kolloidal gelöstem* geben die Autoren nicht an.

[2]) A. Skita wendet bei der von ihm modifizierten Methode Paals einen Überdruck von 1 Atmosphäre an. Vgl. Ber. d. d. chem. Ges. **42**, 1630 (1909); **45**, 3595 (1912).

[3]) Vgl. Wilsmore, Journ. chem. Soc. **91**, 1939 (1907) (Ref. Chem. Zentralbl. **1908**, I, 348). H. Staudinger u. H. W. Klever, Ber. d. d. chem. Ges. **44**, 2212 (1911). C. Harries u. K. Gottlob, diese Annalen **383**, 228 (1911). E. Ott, diese Annalen **401**, 173 (1913); Ber. d. d. chem. Ges. **47**, 2391, 2393 (1914); **48**, 1352 (1915); **52**, 663 (1919).

Digitized by Google

die Undecylensäure, kann glatter als durch Phosphorpentachlorid durch *Thionylchlorid*, das für die präparative Darstellung der Olefincarbonsäurechloride ganz besonders geeignet ist, in ihr Chlorid verwandelt werden. Dieses ist gegen kaltes Wasser genügend beständig, so daß die Vereinigung mit dem Vanillylamin und den andern Oxybenzylaminen nach der Methode von Schotten und Baumann möglich ist. Aber auch das andere Spaltungsprodukt der pyrogenen Ricinusölspaltung, das *Önanthol*, läßt sich nach der von Doebner[1]) angegebenen synthetischen Methode durch Malonsäure und Pyridin leicht und mit guten Ausbeuten in die *$\Delta^{\alpha,\beta}$-Nonylensäure* verwandeln. Da diese ebenfalls sehr scharfe Pfefferarten bei der Kombination mit den Oxybenzylaminen liefert, ist also die Ricinusölspaltung eine besonders ergiebige Quelle für die Olefincarbonsäuren der 9- und 11-Kohlenstoffreihe, die dadurch synthetisch leichter zugänglich sind als die im Capsaicin des spanischen Pfeffers enthaltene Decylensäure.

Oxybenzaldoxime.

Zu einer Natriumalkoholatlösung wird eine heiß konzentrierte wäßrige Lösung von Hydroxylaminchlorhydrat, das in geringem Überschuß sein muß, so daß die entstehende Hydroxylaminlösung durchaus kein freies fixes Alkali enthält, zugefügt und vom Kochsalz abfiltriert. Zu möglichst vollständiger Oximierung werden nur $^2/_3$ bis $^3/_4$ der dem Hydroxylamin entsprechenden Oxyaldehydmengen zugegeben. Nach mehrstündigem Kochen und Abdampfen des Alkohols wird das gebildete Oxim durch Wasserzusatz abgeschieden, Reste werden aus der Mutterlauge durch Ausäthern gewonnen. Die Ausbeuten schwanken zwischen 90 und 98 Proz. der theoretisch möglichen.

[1]) Doebner, Ber. d. d. chem. Ges. **33**, 2140 (1900); **35**, 1136 (1902).

Digitized by Google

Oxybenzylamine.

Eine wäßrige Lösung von Palladiumchlorür, die 0,25 g Palladium entspricht, wird in einer Schüttelbirne mit aufgesetztem Tropftrichter durch Schütteln in einer Wasserstoffatmosphäre reduziert. Nach dem Abdekantieren der Salzsäure wird das ausgeschiedene Palladium durch Waschen mit Alkohol entwässert. Durch den Tropftrichter wird nun eine Lösung von 10 g des zu reduzierenden Oxims in Alkohol zugegeben. Die Schüttelbirne steht durch eine Ansatzröhre, die zugleich als Achse dient, mit einem umgekehrten Meßzylinder in Verbindung, aus dem durch eine Niveauflasche Wasserstoff unter dem Druck einer Wassersäule von etwa 75 cm in die zuvor mit Wasserstoff gefüllte Schüttelbirne eingedrückt wird. Wasserstoffaufnahme, die an einem Blasenzähler und durch Ablesen am Meßzylinder verfolgt werden kann, tritt erst dann auf, wenn angesäuert wird. Wir verwendeten dazu rauchende Salzsäure[1]) und setzten die erforderliche Säuremenge (etwa 6 ccm) auf einmal zu. Sobald die am Meßzylinder abgelesene Wasserstoffmenge mit der berechneten übereinstimmt, hört die Wasserstoffaufnahme vollständig auf. Die Reaktionsdauer schwankte bei 10 g der Oxime zwischen 3 und 6 Stunden.

Nach dem Abfiltrieren des Palladiums wird die Lösung des Aminchlorhydrates im Vakuum eingedampft, wobei dasselbe in der berechneten Menge, und meist rein weiß, zurückbleibt. Nur beim Amin aus dem β-Resorcylaldehyd wurde ein rotgefärbtes, schwer zu reinigendes Chlorhydrat erhalten. Das Verfahren wurde bisher zur Darstellung von *2-* und *4-Oxy-1-benzylamin*, von *3-Methoxy-4-oxy-1-benzylamin* (Vanillylamin) und von *2,4-Dioxy-1-benzylamin* (*β-Resorcylamin*) angewandt. Beim

[1]) In anderen Fällen katalytischer Reduktionen mit Platin als Überträger wirkte Chlorwasserstoff als reaktionshemmendes Kontaktgift! Vgl. E. Ott, Ber. d. d. chem. Ges. 46, 2173/2174 (1913).

Digitized by Google

Aufbewahren der Chlorhydrate von 4-Oxy-1-benzylamin und vor allem von Vanillylamin tritt allmählich durch Oxydation Rotfärbung ein, die sich durch Auswaschen mit Aceton beseitigen läßt, nach dieser Reinigung veränderten sich die Chlorhydrate dann nicht mehr.

Pyrogene Spaltung des Ricinusöls.

Nach Krafft[1]) und F. Becker[2]) wird die Spaltung durch Destillation im Vakuum der Wasserstrahlpumpe bewirkt. Wir fanden es vorteilhafter in der Ausführung und erhielten erheblich bessere Ausbeute an Undecylensäure, als wir das Ricinusöl im Hochvakuum (unterhalb von 1 mm Druck)[3]) aus einem langhalsigen Fraktionierkolben über eine in den Hals des Kolbens eingeführte Spirale aus etwa 30 cm dünnem Platindraht (0,15—0,25 mm), die durch einen Strom von 3—4 Amp. zur starken Rotglut geheizt wurde, destillierten. Zur Zurückhaltung des stets gebildeten Wassers, mit dem die Undecylensäure sehr flüchtig ist, wird nach einer nicht gekühlten Vorlage eine zweite mit sehr weiten Zuleitungsröhren versehene Vorlage vorgeschaltet, die auf mindestens — 80° abgekühlt wird. Die Siedecapillare wird durch eine enge, direkt in den Fraktionierkolben führende Ansatzröhre eingesetzt. Nach dem Abtrennen des Wassers im Scheidetrichter wurde die Fraktionierung der Reaktionsprodukte im Hochvakuum ausgeführt, wobei das *Önanthol* bei etwa 45°, die *Undecylensäure* bei 130—140° überging. Die Spaltung von 500 g Ricinusöl war in etwa 4 Stunden beendet, ein erheblicher Kolbenrückstand erstarrt dann plötzlich zu einer gallertartigen Masse. Aus insgesamt 1400 g Ricinusöl wurden etwa

[1]) Ber. d. d. chem. Ges. **10**, 2034 (1877).

[2]) Ber. d. d. chem. Ges. **11**, 1412 (1878).

[3]) Ebenso gute Resultate werden (nach Versuchen von Herrn cand. chem. C. Lutter) bei 15 mm Druck erzielt, wenn eine sehr schnell wirkende Kapselpumpe angewendet wird, welche die erheblichen Gasmengen (Acetylen und Äthylen) schnell absaugt.

Digitized by Google

350 g reine Undecylensäure erhalten, während man nach der bisherigen Methode nach F. Becker nur 10 Proz. des angewandten Öls erhält. Als bisher nicht beobachtetes Spaltungsstück kann durch Extraktion der rohen Undecylensäure mit Wasser *Glycerin* in erheblichen Mengen gewonnen werden, daneben bildet sich stets *Akrolein*, wodurch sich auch das Auftreten von Wasser erklärt.[1])

$\Delta^{\alpha,\beta}$-Nonylensäure.

Die Säure wurde schon von Fittig und Schneegans aus Önanthol, Essigsäureanhydrid und Natriumacetat dargestellt.[2]) Wir erhielten sie nach der allgemeinen Methode von Doebner durch *gelindes* Erwärmen einer Mischung von 11,5 g *Önanthol* (Siedep. 152 bis 155°), 15 g *Malonsäure*, 10 g *Pyridin* und 20 ccm *Methylalkohol* (zur Herstellung einer homogenen Lösung) bis zum Aufhören der Kohlendioxydentwicklung. Nach dem Abdunsten des Methylalkohols wurde zur Entfernung des Pyridins mit verdünnter Salzsäure aufgenommen, das abgeschiedene Öl zur Reinigung in Sodalösung gelöst und nach dem Ausäthern nichtsaurer Bestandteile die ölige Säure durch Ansäuern der Sodalösung mit Salzsäure abgeschieden. Es wurden 7 g Säure vom Siedep.$_9$ 140—150° (Hauptmenge bei 145°) erhalten. Als ungesättigte Säure wurde sie durch Bromaddition, die unter Selbsterwärmung und nur geringer Bromwasserstoffabspaltung stattfindet, gekennzeichnet.

Aus 5 g Säure und 10 g *Thionylchlorid* wurden 5,5 g *Chlorid* (98 Proz. d. Th.) vom Siedep.$_{10}$ 103—104° erhalten; die Reaktion findet schon in der Kälte statt.

0,4267 g gaben (nach Carius) 0,3544 AgCl.

	Ber. für $C_9H_{15}OCl$	Gef.
Cl	20,31	20,55

[1]) Nach Beobachtungen des einen von uns mit Herrn cand. chem. C. Lutter.

[2]) Diese Annalen 227, 80 (1885).

Digitized by Google

$\Delta^{\beta,\gamma}$-Hexylensäure- (Hydrosorbinsäure-)chlorid.

Die Säure wurde nach Angaben von Fittig[1]) durch Reduktion von Sorbinsäure durch Natriumamalgam erhalten und mittelst *Thionylchlorid* in ihr *Chlorid* vom Siedep.$_9$ 42—43° verwandelt.

Bei der Darstellung der Chloride, besonders der höheren Olefincarbonsäuren, arbeitet man zweckmäßig bei niedrigen, 30—40° nicht übersteigenden Temperaturen und trennt überschüssiges Thionylchlorid durch Erwärmen im *Vakuum* von dem Säurechlorid, da bei höheren Temperaturen leicht Verharzung eintritt. Beim Arbeiten mit *Phosphorpentachlorid* leidet die Ausbeute bei den höheren Chloriden durch starke Verharzung.

Darstellung der Säureamide.

Da die freien Oxybenzylamine, vor allem das für die vorliegenden Zwecke wichtigste, das Vanillylamin, sehr unbeständig sind, haben wir uns zur Gewinnung der Säureamide stets der Methode von Schotten und Baumann bedient. Die Ausbeuten waren bei den Chloriden der 4. bis 6. Kohlenstoffreihe nur gering und die erhaltenen Amide unrein, mit steigender Kohlenstoffzahl, schon von C_9 an, waren die Ausbeuten gute, zum Teil wurden sofort analysenreine Rohprodukte in fast den berechneten Ausbeuten erhalten.

Es wurden z. B. 1,9 g ($^1/_{100}$ Mol.) *Vanillylaminchlorhydrat* in 25 ccm lauwarmem Wasser gelöst und 1,5 g calc. Soda in 5 ccm Wasser zugefügt. In die erhaltene Lösung der Base wurde allmählich $^1/_{100}$ Mol. der betreffenden Säurechloride unter kräftigem Schütteln eingetropft. Das meistens als dickflüssiges Öl oder butterweiche Masse abgeschiedene Amid wurde nach längerem Stehen unter Zusatz von viel überschüssiger Sodalösung in Äther aufgenommen und nach dem Trocknen der Lösung

[1]) Diese Annalen **161**, 309 (1872).

Digitized by Google

durch Natriumsulfat durch Abdampfen als zähflüssiger Rückstand erhalten, der durch kurzes Erhitzen im Vakuum von den letzten Ätherresten befreit wird. Die festen Amide wurden direkt abgesaugt und meist aus Alkohol umkrystallisiert. Die *Vanillyl*amide ungesättigter Säuren färben sich wie die Base leicht durch Oxydation durch den Sauerstoff bräunlich. Alle bisher geprüften *Vanillyl*amide ungesättigter Säuren zeigen in alkoholischer Lösung eine grüne Eisenchloridreaktion, das reine *Stearinsäure*-vanillylamid dagegen zeigt keine Grünfärbung mit Eisenchlorid. Bisher wurden folgende Amide dargestellt:

I. Variierung des Aminrestes.

1. *Undecylensäure-4-oxy-3-methoxy-1-benzylamid (Vanillylamid).*

Schwach bräunliche Masse von talgartiger Konsistenz, Schmelzp. gegen 40°. Im Hochvakuum (unterhalb von $^1/_{10}$ mm) fast unzersetzt als gelbliches Öl destillierend, das sehr langsam wieder vaselineartig fest wird. Wegen allzu großer Löslichkeitsverhältnisse in kleinen Mengen nicht umkrystallisierbar.[1]) Löslich in Natronlauge, eine alkoholische Lösung wird durch einen Tropfen Eisenchloridlösung gelbgrün gefärbt. Äußerst scharfer Pfeffergeschmack, neben angenehmem, an Aprikosen erinnernden Geruch.

I. 0,3627 g gaben 14,2 ccm trocknes Stickgas bei 17° und 770 mm Druck.

II. 0,3100 g gaben 12,0 ccm trocknes Stickgas bei 18° und 774 mm Druck.

	Ber. für	Gef.	
	$C_{19}H_{29}O_3N$	I	II
N	4,39	4,59	4,53

[1]) Die Verbindung wurde inzwischen auch von G. K. Nelson [Journ. Am. chem. Soc. **41**, 2121 (1919)] dargestellt, der durch Umkrystallisieren den Schmelzp. auf 53—55° erhöhen konnte.

Digitized by Google

2. *Undecylensäure-4-oxy-1-benzylamid.*

Weiße krystallinische Verbindung vom Schmelzpunkt 86° und ziemlich scharfem Geschmack. Keine grüne Eisenchloridreaktion.

0,2404 g gaben 9,6 ccm trocknes Stickgas bei 18° und 772 mm Druck.

	Ber. für $C_{18}H_{27}O_2O$	Gef.
N	4,85	4,77

3. *Undecylensäure-2-oxy-1-benzylamid* (*Salicylamid*).

Als Rohprodukt halbfeste weiße Verbindung von erheblich weniger scharfem Geschmack als die isomere para-Oxyverbindung.

4. *Undecylensäure-4-methoxy-1-benzylamid* (*Anisylamid*).[1])

Das weiße, eine Spur scharfschmeckende Rohprodukt wurde nach einmaliger Krystallisation aus Alkohol in schönen, perlmutterglänzenden, weißen Krystallblättchen vom Schmelzp. 91° erhalten, die sich fettig anfühlen. Das Amid besaß weder im festen Zustand noch in konzentrierter alkoholischer Lösung irgendwelchen Geschmack.

0,2296 g gaben 8,5 ccm trocknes Stickgas bei 15° und 774 mm Druck.

	Ber. für $C_{19}H_{29}O_2N$	Gef.
N	4,62	4,48

5. *Undecylensäurebenzylamid.*

Wachsartige, gelbe Masse, die schon als Rohprodukt absolut geschmacklos ist. Geruch nach Aprikosen. Schmelzp. 51—52°.

[1]) Für die liebenswürdige Überlassung einer Probe von Anisylaminchlorhydrat sind wir Herrn Geh.-Rat Salkowski sehr zu Dank verpflichtet.

Digitized by Google

6. *Undecylensäure-4-oxy-1-phenylamid.*

Aus Amidophenolsulfat, Soda und Undecylensäurechlorid als schwach graugrüner, geschmackloser Niederschlag. Aus wenig Alkohol krystallisiert, Schmelzp. 107°

7. *Sorbinsäurepiperidid.*

Aus Sorbinsäurechlorid und Piperidin in wasser. freiem Äther. Weiße, schön in großen Krystallen aus Alkohol krystallisierende Verbindung vom Schmelzp. 77°. Schon im festen Zustand von stark bitterem, aber nicht scharfen, und in keiner Weise an Pfeffer auch nur erinnernden Geschmack.

II. Variierung des Säurerestes.

1. *Croton- und Hexylensäurevanillylamide.*

Die beiden Amide wurden in nur geringer Ausbeute und nicht in reinem Zustand als dickflüssige Öle erhalten. Der Geschmack ist ziemlich scharf, aber nicht so lange anhaltend wie bei den Vanillylamiden der höheren Olefincarbonsäuren.

Analyse von Hexylensäurevanillylamid.

I. 0,2590 g gaben 9,80 ccm trocknes Stickgas bei 18° und 769 mm Druck.

II. 0,1174 g gaben 4,60 ccm trocknes Stickgas bei 18° und 758 mm Druck.

	Ber. für	Gef.	
	$C_{14}H_{19}O_3N$	I	II
N	5,62	4,41	4,49

2. *$\Delta^{\alpha,\beta}$-Nonylensäurevanillylamid.*

Das ölige Rohprodukt wurde in Äther aufgenommen und hinterblieb nach dem Abdunsten der getrockneten, ätherischen Lösung, wobei starker Hustenreiz die Flüchtigkeit geringer Substanzmengen mit den Ätherdämpfen anzeigte, in guter Ausbeute als bräunliches,

Digitized by Google

durchsichtiges Öl. Dieses nahm nach dem vollkommenen Vertreiben der letzten Ätherreste durch Erwärmen im Vakuum die Konsistenz eines dicken, honigartigen, fadenziehenden Sirups an. Es besitzt einen ungemein scharfen und brennenden Pfeffergeschmack, der dem des Undecylensäurevanillylamids in nichts nachsteht. Eisenchlorid färbt die alkoholische Lösung grün.

0,2012 g gaben 8,2 ccm trocknes Stickgas bei 20° und 768 mm Druck.

	Ber. für $C_{17}H_{25}O_3N$	Gef.
N	4,81	4,80

3. *$\Delta^{\alpha,\beta}$-Nonylensäure-4-oxy-1-benzylamid.*

Als weißes Rohprodukt von butterartiger Konsistenz erhalten. Im Geschmack sehr scharf, *schärfer* als die entsprechende Verbindung der *Undecylensäure*. Es könnte sich hier doch um einen verstärkenden Einfluß der Lage der Doppelbindung in α,β-Stellung handeln, falls nicht rein physikalische Gründe, wie der halbfeste Aggregatzustand oder größere Wasserlöslichkeit, als Ursache des schärferen Geschmacks anzusprechen sind. Mit Eisenchlorid keine Grünfärbung in alkoholischer Lösung.

4. *Ölsäurevanillylamid.*

Ziemlich dünnflüssiges, nur wenig gefärbtes Öl von sehr scharfem Geschmack, der aber nicht zugleich angenehm aromatisch wie bei den Nonylen- und Undecylensäureverbindungen ist. Mit Eisenchlorid färbt sich die alkoholische Lösung grünlich.

5. *Zimtsäurevanillylamid.*

Durch Zutropfen einer Lösung von Zimtsäurechlorid (aus der Säure durch Thionylchlorid darstellbar) in wasserfreiem Äther in die sodaalkalische Aminlösung als schwach rot gefärbter Niederschlag, der aus Äther als fast weißes Pulver vom Schmelzp. 138° erhalten

Digitized by Google

wird. Das Amid besitzt keinen sehr starken, aber sehr angenehm aromatischen Pfeffergeschmack und riecht ganz schwach fruchtartig. Seine alkoholische Lösung wird durch Eisenchlorid sehr schön und intensiv smaragdgrün gefärbt. Die Färbung ist viel intensiver als bei allen *Vanillyl*amiden der *Olefincarbonsäuren.*

0,2854 g gaben 12,1 ccm trocknes Stickgas bei 18° und 748 mm Druck.

	Ber. für $C_{17}H_{17}O_3N$	Gef.
N	4,94	4,85

6. *Palmitinsäurevanillylamid.*

Das Rohprodukt, aus käuflicher „reiner" Palmitinsäure über das Chlorid dargestellt, schmeckte bereits im festen Zustand ziemlich scharf. Nach dem Umkrystallisieren aus sehr viel Äther war der Geschmack im festen Zustande fast verschwunden, in alkoholischer Lösung aber noch sehr intensiv. Schmelzp. 79°. Auch das umkrystallisierte Produkt zeigte, einem Gehalt an *Ölsäure*vanillylamid entsprechend, in konzentrierter alkoholischer Lösung eine *starke* Grünfärbung mit Eisenchlorid. (Vgl. dagegen das Verhalten der *reinen* Stearinsäureverbindung, S. 337.)

7. *Stearinsäurevanillylamid.*

Nach den bei der Palmitinsäureverbindung gesammelten Erfahrungen wurde, wie schon im theoretischen Teil erwähnt, auf die Anwendung einer absolut ölsäurefreien Stearinsäure wegen der grundsätzlichen Bedeutung eines sicheren Nachweises, daß hier die Olefindoppelbindung der Fettsäure die Ursache des scharfen Geschmacks ist, besonderer Wert gelegt. Die aus dem reinen *Tristearin* vom korr. Schmelzp. 73° durch Verseifung gewonnene *Stearinsäure* erstarrte zwischen 68,7 und 68,6° (unkorr.) vollständig. Die Temperaturbeobachtung geschah dabei durch ein in die erstarrende Säure eintauchendes, in $^1/_{10}$° geteiltes abgekürztes Thermometer.

Digitized by Google

Ebenso erstarrte das aus der Säure durch mehrstündiges Erwärmen mit Thionylchlorid auf dem Wasserbad gewonnene *Chlorid* vom Siedep.$_9$ 205° nach sehr kurzem Stehen bei Zimmertemperatur (etwa 20°) von selbst.

Das aus dem Chlorid gewonnene *Vanillylamid* vom Schmelzp. 86° war nicht nur im festen Zustand, sondern auch in konzentrierter alkoholischer Lösung vollkommen geschmacklos, und zeigte im Gegensatz zu allen bisher geprüften *Olefin*carbonsäurevanillylamiden auch *keine* grüne Eisenchloridreaktion.

Bei der Verbrennung nach Dumas lieferte es das mehrfache Volum des zu erwartenden Stickstoffs an Athylen.

0,2661 g gaben nach Kjeldahl 6,05 ccm $^n/_{10}$-NH_3, gemessen durch $^n/_{10}$-HCl.

	Ber. für $C_{26}H_{45}O_3N$	Gef.
N	3,46	3,19

Digitized by Google

Berichtigung.

In Richard Meyers Jahrbuch für Chemie 28. 122 (1920) ist eine Berichtigung des Referenten erschienen, die sich auf die Indandion-Abhandlungen von Freund und mir mit anderen jüngeren Mitarbeitern bezieht und die der Auffassung Raum geben könnte, als würde von mir ein überwiegender Anteil an diesen gemeinsamen Untersuchungen in Anspruch genommen. Die in Rede stehende Berichtigung hat ihre Ursache in der mißverstandenen Auffassung eines Briefes, den ich an den Herrn Referenten gerichtet hatte, weil ich meinen wissenschaftlichen Anteil in den in Frage kommenden Referaten nicht genügend gewahrt fand. Der Inhalt der Berichtigung kann jedoch nunmehr zu Mißverständnissen in der anderen Richtung Veranlassung geben, und eine Richtigstellung im Jahrbuch ist wegen Einstellung des Erscheinens leider nicht mehr möglich. Ich möchte daher betonen, daß es mir ferngelegen hat, den tatsächlichen Anteil meines verstorbenen Chefs und Lehrers M. Freund an diesen Arbeiten zu schmälern.

K. Fleischer.

(Geschlossen am 15. September 1921.)

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig.

Digitized by Google